THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR
STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean-Pierre SCHREIBER

INTERACTION ENTRE LE DNA ET DEUX TYPES DE MUTAGENES

Soutenue le 18 Mai 1972 devant la Commission d'Examen

MM.	J. P. EBEL	Président
	M. DAUNE	Examinateur
	G. LAUSTRIAT	Examinateur
	J. C. MOUNOLOU	Examinateur

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550001_0005

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR
STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean-Pierre SCHREIBER

INTERACTION ENTRE LE DNA ET DEUX TYPES DE MUTAGENES

Soutenue le 18 Mai 1972 devant la Commission d'Examen

MM.	J. P. EBEL	Président
	M. DAUNE	Examinateur
	G. LAUSTRIAT	Examinateur
	J. C. MOUNOLOU	Examinateur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

U. L. P.

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
STRASBOURG

Président : Professeur G.OURISSON
Vice-Présidents : Professeur A.CHAUMONT
Professeur G.LAUSTRIAT
Secrétaire Général : G. KIEHL

PROFESSEURS, MAITRES DE CONFERENCES, DIRECTEURS et MAITRES DE RECHERCHE des U.E.R. RESPONSABLES DES DOCTORATS ès-SCIENCES

Doyens honoraires : A.KIRMANN, P.LACROUTE, H.J.MARESQUELLE, J.H.VIVIEN, G.MILLOT.
Professeurs honoraires : P.DE BEAUCHAMP, L.BOISSELET, H.CARTAN, G.CERF, C.CHABAUTY, A.CHRETIEN, J.DENY, Ch.EHRESMANN, M. FRECHET, Mle S. GILLET, A.HEE, R.HOCART, A. KIRRMANN, G.LEMEE, P.L'HERITIER, A.LICHNEROWICZ, H.J.MARESQUELLE, L.NEEL, Ch.SADRON, F.TERROINE, H.VILLAT, H.WEISS, Et.WOLF, J.YVON.
Maître de conférences honoraire : R.WEIL.

Professeurs :

H.FORESTIER	T	Chimie générale
J.ROTHE	T	Physique du Globe
P.LACROUTE	T	Astronomie
J.H.VIVIEN	T	ZooL.&Embryol.exp.
A.MAILLARD	T	Physicoch.du Pétrole
S.GORODETZKY	T	Phys.gén.& Phys.nucl.
L.SACKMANN	T	Mécanique des Fluides
J.BYE	T	Chimie Physique
Mle M.PEREY	T	Chimie nucléaire
S.GOLDSZTAUB	T	Minéral.& Pétrogr.
P.JOLY	T	Biologie générale
H.BENOIT	T	Physicoch.macromol.
P.CUER	T	Phys.gén.& Phys.corpusc.
G.MILLOT	T	Géol.& Paléontologie
R.LECOLAZET	TTP	Physique du Globe
H.SAUCIER	TTP	Minéralogie
R.ROHMER	T	Chimie minérale
Mle A.GAGNIEU	TTP	Botanique
F.STUTINSKY	T	Physiologie générale
B.WURTZ	TTP	Chimie biologique
J.BRENET	T	Electrochimie
J.P.EBEL	T	Chimie biologique
G.OURISSON	TTP	Chimie
A.COCHE	TTP	Physique nucléaire
R.CERF	T	Physique générale
J.FRENKEL	TTP	Mathématiques
A.DELUZARCHE	TTP	Chimie
R.ARMBRUSTER	TTP	Physique
A.ROCHE	TTP	Physique du Globe
L.HIRTH	T	Microbiologie
A.FUCHS	T	Mécanique rationnelle
A.GALLMANN	TTP	Physique
P.MIALHE	TTP	Physiologie animale
J.PARROD	TTP	Chimie
Mme D.MAGNAC	TTP	Physique
M.DAUNE	PSC	Physique
J.P.ADLOFF	TTP	Chimie nucléaire
D.BERNARD	TTP	Méth.math.de la Phys.
E.DANIEL	T	Physique expérimentale
P.CHEVALLIER	T	Physique
G.REEB	T	Topologie
J.WUCHER	TTP	Physique
Mme M.BRINI	TTP	Chimie
H.DURANTON	TTP	Botanique
R.WEISS	TTP	Chimie
P.FEDERLIN	TTP	Chimie
J.P.SCHWING	TTP	Chimie
M.SIESKIND	PSC	Physique
G.MONSONEGO	T	Physique théorique
C.WIPPLER	T	Physicoh.des Hts Polym.ind.
G.WEILL	TTP	Physique
A.CLAUSS	PSC	Chimie
E.FOLLENIUS	PSC	Zoologie
J.LUCAS	TTP	Géologie
J.J.THIEBOLD	PSC	Biologie animale
G.GLAESER	T	Mathématiques
J.H.WEIL	TTP	Chimie biologique
X.FERNIQUE	PSC	Mathématiques
F.GAUTIER	PSC	Physique
V.AVANISSIAN	T	Analyse supérieure
F.LACROUTE	T	Biologie végétale
J.P.EBERHART	PSC	Minéralogie
J.M.LEHN	TTP	Chimie
Cl.ROBERT	PSC	Physique
F.BECKER	PSC	Physique mathématique
M.KAROUBI	TTP	Mathématiques
Fr.SCHALLER	TTP	Biologie générale
Fr.GAULT	T	Chimie organique
M.GOUNOT	PSC	Botanique
J.DEHAND	PSC	Chimie minérale
C.GODBILLON	PSC	Mathématiques
J.ROUX	PSC	Botanique
R.VOLTZ	PSC	Physique théorique
A.MICHARD	PSC	Géologie
Y.BOULANGER	PSC	Chimie biologique
J.P.BRETAGNOLLE	PSC	Mathématiques
J.J.RIEHL	PSC	Chimie

Professeurs associés :

A.BANDERET (E.A.H.P.)- D. GOLDSMITH (Chimie)- H.HAKEN (Phys.)- L.LEITE-LOPEZ (Phys.)- M.HERRERA (Math.)- M.VAN-REGENMORTEL (Bot.)-

Maîtres de Conférences et Chargés d'Enseignement :

M.GROSMANN	Physique
M.DAIRE	Chim.Phys.ind.&Sc.ds Mat.
G.DUNOYER de SEGONZAC	Géologie
J.MARTINET	Mathématiques
J.P.JOUANOLOU	Mathématiques
Ph.ROPARTZ	Psycho-Physiologie
Ph.RICHARD	Physiologie animale
G.SOLLADIE	Chimie organique
P.BENVENISTE	Physiologie végétale
Mme C.SCHOELLER	Mathématiques
J.BERSTEL	Informatique
J.FARAUT	Mathématiques
J.P.RAMIS	Mathématiques gén.

Maître de Conférences adjoint :

Mme J.SITTLER	Géologie

Maître de Conférences associé :

P.FELLNER	Biochimie

Professeurs et Maîtres de Conférences en fonction au C.U.H.R. :

P.TAGLANG	T	Physique
J.P.DONNET	TTP	Chimie Physique
R.WEY	TTP	Chimie
H.DANAN	PSC	Physique
G.SUTTER	PSC	Physique électronique
J.STREITH	PSC	Chimie
Mme Chr.WINTER	M.de Cf.	Physique
J.FAURE	M.de Cf.	Chimie Physique
Fr.SCHMITT	M.de Cf.	Physique
G.SCHIFFMANN	M.de Cf.	Mathématiques

Professeurs et Maîtres de Conférences en fonction dans les I.U.T. :

Strasbourg

Ch.TANIELLIAN	M.de Cf.	Chimie
M.GROSS	M.de Cf.	Chimie

Mulhouse

G.PERNY	T	Phys. appl.
R.MANQUENOUILLE	M.de Cf.	Math. appl.
G.METZGER	M.de Cf.	Electronique
B.LAVILLE-St MARTIN	M.de Cf.	Phys. appl.
R.STEIN	M.de Cf.	Phys. électron.

Directeurs et Maîtres de recherche :

P.DEJOURS	DR	Physiol.respiratoire
A.KOVACS	DR	Physicochim.macromol.
J.MARCHAL	DR	Physicochim.macromol.
A.MEYER	DR	Physique
J.MEYER	DR	Botanique
S.NIKITINE	DR	Physique
N.PERAKIS	DR	Physique
P.REMPP	DR	Physicochim.macromol.
R.WEIL	DR	Minéralogie
F.BECK	MR	Physique nucléaire
J.F.BIELLMANN	MR	Chimie
M.BONHOMME	MR	Géologie
P.BOUVEROT	MR	Physiol.respiratoire
H.BRAUN	MR	Physique corpuscul.
Mle CHAMPAGNE M.	MR	Biophysique
A.CORET	MR	Physique
M.CROISSIAUX	MR	Physique nucléaire
Mle J.DOUBINGER	MR	Géologie
S.EL KOMOSS	MR	Physique
J.P.VON ELLER	MR	Géologie
A.FRIDMANN	MR	Physique corpuscul.
E.HEINTZ	MR	Psycho-physiologie
J.B.GRUN	MR	Physique
G.KAUFFMANN	MR	Chimie
A.KNIPPER	MR	Physique
A.LIORET	MR	Physique nucléaire
Mme C.MIALHE	MR	Physiologie
Th.MULLER	MR	Physique
G.MUNSCHY	MR	Physique
R.PFIRSCH	MR	Botanique
A.PORTE	MR	Physiologie
J.POUYET	MR	Biophysique
J.RINGEISSEN	MR	Physique
F.SCHEIBLING	MR	Spectrométrie nucl.
F.SCHUE	MR	Chimie
P.SIFFERT	MR	Phys.rayon.&Elect.nucl.
V.SINN	MR	Physicochim.nucléaire
Cl.SITTLER	MR	Géologie
A.SKOULIOS	MR	Physicochim.nucléaire
M.SUFFERT	MR	Basses Energies
Mme A.TABOURET-KELLER	MR	Psychol.sociale
R.VAROQUI	MR	Physichoch.macromol.
A.VEILLARD	MR	Chimie
G.WALTER	MR	Phys.ryon.&Electron.nucl.
J.P.WENIGER	MR	Zoologie
R.WOLFF	MR	Chimie
R.ZANA	MR	Physicoch.macromol.

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Monsieur le Professeur DAUNE. Qu'il veuille bien trouver ici, l'expression de ma reconnaissance, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir ensuite, tout au long de ce travail, prodigué à la fois ses encouragements et ses conseils.

En me proposant à la fin de mes études un poste d'Assistant dans son laboratoire, en me permettant ensuite de choisir une direction de recherche qui n'était pas la sienne, Monsieur le Professeur LAUSTRIAT a permis la réalisation de ce travail dont il a accepté d'être juge. Je l'en remercie sincèrement.

C'est grâce à Monsieur le Professeur MOUNOLOU que ce travail a pris son orientation définitive. Qu'il veuille bien trouver ici mes remerciements pour ses conseils, sa gentillesse et sa présence dans ce jury.

Monsieur le Professeur EBEL m'a fait l'honneur de bien vouloir accepter la présidence de ce jury. Je l'en remercie vivement.

Enfin, que toutes les personnes du laboratoire, qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de ma reconnaissance , et tout spécialement ma femme dont la collaboration ne m'a jamais été mesurée, et Madame Diebolt pour la réalisation matérielle de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I - INTERACTIONS ENTRE ACIDES NUCLEIQUES ET IONS METALLIQUES

A) ROLE BIOLOGIQUE DES METAUX AU NIVEAU DES ACIDES NUCLEIQUES

1) Présence de cations 3
2) Modifications d'actions enzymatiques 4
3) Mutagénèse 5

B) INTERACTIONS Cu^{++} - DNA

1) Introduction : Mise au point bibliographique 7
2) L'étude du complexe Cu^{++} - DNA
a) Matériel 11
b) Méthodes
- Polarographie 12
- Spectrophotométrie différentielle 13
- Courbes de fusion 16
- Dichroïsme circulaire 17
- Diffusion de la lumière, viscosité, constante de sédimentation 18
c) Résultats expérimentaux
- Stoechiométrie : polynucléotides 20
DNA 21
- Spectrophotométrie différentielle 24
- Courbes de fusion 27
- Dichroïsme circulaire 29
- Diffusion de la lumière, viscosité, constante de sédimentation 30
3) Discussion
Fixation de Cu^{++} sur les polydésoxyribonucléotides en double hélice : le DNA 32
le dAT 36
le dGdC 36
Fixation de Cu^{++} sur les polynucléotides en simple brin 37

C) CONCLUSION 39

CHAPITRE II - INTERACTIONS ENTRE DESOXYRIBONUCLEOTIDES ET COLORANTS D'ACRIDINE

A) INTRODUCTION 41

B) LES COMPLEXES COLORANTS - POLYDESOXYRIBONUCLEOTIDES

a) Matériel et Méthodes

1) Matériel 44

2) Méthodes

- Absorption 44
- Emission de fluorescence 44
- Polarisation de fluorescence 45
- Durée de vie de fluorescence 47

b) Résultats expérimentaux

1) Spectres d'absorption 49

2) Spectres d'émission de fluorescence 49

3) Mesures d'inhibition de fluorescence par KI 50

4) Mesures des taux de polarisation de fluorescence 51

5) Mesures des durées de vie de fluorescence 52

6) Le bromure d'éthidium 53

c) Discussion 54

Extinction de fluorescence par formation d'un complexe à transfert de charge 56

C) COMPLEXE A TRANSFERT DE CHARGE ET MUTAGENESE 60

CONCLUSION 63

INTRODUCTION GENERALE

Dans tout être vivant, la replication exacte du DNA assure le transfert des caractères héréditaires d'une génération à la suivante. Toute erreur commise lors de la replication va se traduire par l'apparition dans la cellule fille d'un DNA différent de celui de la cellule mère : les deux cellules possèdent alors un génotype différent. On appelle mutation, l'évènement qui entraine une altération héréditaire du génotype. Dans un certain nombre de cas, la modification du génotype d'une souche sauvage va se traduire par une modification corrélative du phénotype, rendant ainsi aisée l'identification des mutants.

On distingue deux types de mutations :

- les mutations spontanées : ce sont les seules à avoir été étudiées pendant longtemps jusqu'à ce qu'en 1927 H.J. Muller montre que les rayons X pouvaient introduire des mutations chez la drosophile.

- les mutations induites : elles peuvent l'être par des substances chimiques ou des radiations.

L'action mutagène de l'acide nitreux fut découverte par Gierer et Mundry (1958) ; la réaction de désamination produite par NO_2H transforme la cytosine en uracile et l'adénine en hypoxanthine.

L'hydroxylamine agit sur les pyrimidines. Citons encore les agents alkylants, la nitrosoguanidine, un certain nombre de colorants comme le bleu de méthylène qui agit comme photocatalyseur en sensibilisant les acides nucléiques à la lumière visible.

L'action mutagène des radiations a fait quant à elle l'objet de nombreuses études, qu'il s'agisse des radiations ionisantes comme les rayons X, les rayonnements α, β ou γ, ou simplement des ultraviolets.

Bien que la plupart de ces actions soient susceptibles d'agir sur un grand nombre des constituants de la cellule et en particulier sur l'ensemble de ses acides nucléiques, les mutations observées sont le fait d'une modification directe de la nature chimique des bases du DNA.

Il existe à côté des substances chimiques citées plus haut, un certain nombre de produits mutagènes dont l'action au niveau du DNA reste inconnue. C'est ainsi que les ions Cu^{++} provoquent l'apparition de colonies "petites" dans une souche de Saccharomyces cerevisiae (Nagai, Yanagishima, Nagai, 1961). Weed et Longfellow (1954) montrent que le même cation modifie le phénotype de Bacillus subtilis.
Les colorants d'acridine, capables comme Cu^{++} de provoquer la mutation "petite" chez la levure, induisent des mutations sur le phage T_4 : depuis les travaux d'Orgel et Brenner en 1961, celles-ci ont fait l'objet de nombreuses études.
Les mutations induites par ce dernier type de substances ont été appelées "frameshift mutation" ou mutations par déplacement du cadre de lecture. Elles se traduisent en général, non par le remplacement d'une base par une autre, mais par la délétion ou l'addition d'une ou de plusieurs bases au DNA de la souche sauvage.

Pour essayer de comprendre ce type d'action mutagène, nous avons étudié les complexes formés avec le DNA par :

- des ions métalliques d'une part ; Cu^{++} essentiellement,
- des colorants d'acridine d'autre part : proflavine, acriflavine, 9-aminoacridine, acridine orange.

Nos résultats nous conduiront entre autres:

- à mettre en évidence la sensibilité particulière de certaines parties du génome à ces agents mutagènes,
- à proposer pour l'action mutagène des colorants d'acridine un mécanisme impliquant un choix parmi les différentes hypothèses formulées sur la replication du DNA.

CHAPITRE I

INTERACTIONS ENTRE ACIDES NUCLEIQUES ET IONS METALLIQUES

A) ROLE BIOLOGIQUE DES METAUX AU NIVEAU DES ACIDES NUCLEIQUES

Résumons rapidement ce que l'on sait actuellement du rôle des cations métalliques dans les mécanismes biologiques où se trouvent impliqués les acides nucléiques.

1) Présence de cations

Il existe toujours des cations fortement liés au DNA ou au RNA extrait des cellules, et cela quelles que soient les précautions prises dans la purification des milieux solvants (Wacker et Vallée, 1959 ; Belokobylskii, Ginturi, Mosulishvili, Karabadze, 1968). Le tableau ci-dessous donne en µg/gr les traces de métaux trouvés dans les acides nucléiques et déterminées par activation neutronique.

	Zn	Cu	Mn
RNA	683	106	31
DNA	1905	39	21

Il est possible que ces polyélectrolytes aient joué un simple rôle d'échangeurs d'ions, et piégé ces cations divalents dans le milieu cellulaire au moment de leur extraction. Si tel n'est pas le cas, le rôle de ces ions in vivo, au niveau des acides nucléiques reste à élucider.

2) Modifications d'actions enzymatiques

In vitro, un certain nombre de systèmes enzymatiques liés au DNA ou au RNA présentent une certaine sélectivité vis à vis des ions métalliques.

DNA polymérase

Le remplacement de Mg^{++} par Mn^{++} provoque des erreurs dans la replication du DNA. Il peut y avoir incorporation de ribonucléotides au lieu de désoxyribonucléotides (Berg, Fancher, Chamberlin, 1963) ou lecture erronée, conduisant par exemple à l'incorporation de thymine à la place de guanine, à partir d'une matrice de poly-dC (Hall, Lehman, 1968). Co^{++} et Zn^{++} permettent également l'activité de l'enzyme (Zimmermann, 1966).

RNA polymérase

Lorsque des polynucléotides sont utilisés comme matrice, les ions divalents jouent un rôle dans l'initiation de la synthèse du RNA. C'est ainsi que le poly-rU et le poly-rA demandent la présence de Mn^{++} pour jouer le rôle de matrice.
Il y a par contre disparition de la spécificité d'initiation dans le cas du DNA, en présence de Mn^{++} (Wilson, Russo, Steck, 1970).

Polynucléotide phosphorylase

Hsieh et Buchanan (1967) ont pu isoler d'une souche particulière d'E. Coli un enzyme nécessitant la présence de Mn^{++} pour polymériser les nucléosides diphosphates.

Ribonucléase (RNAse)

La fixation de certains ions (Ag^{+}, Hg^{++}, In^{+++}) sur le RNA empêche sa dégradation par la RNAse (Singer, Fraenkel-Conrat, 1962). On trouve par contre que l'activité de la ribonucléase passe par un maximum pour une certaine concentration c_x d'ions divalents, concentration qui décroit par ailleurs lorsque l'on passe du manganèse au cuivre en suivant l'ordre de la série d'Irwing-Williams de stabilité des complexes (Mn<Co<Ni<Cu>Zn).

Désoxyribonucléase (DNAse I)

Wiberg en 1958, Schack et Bynum en 1964 montrent que la concentration en ions divalents (Mg^{++} ou Mn^{++}) nécessaire à l'action enzymatique croit avec la concentration en DNA. L'enzyme manifeste de plus une sélectivité qui est fonction du type d'ions divalents présents. Bollum (1965) note ainsi que lors de l'action de la désoxyribonucléase sur le poly-dIdC, la coupure de

la chaîne de poly-dC n'a lieu qu'en présence de Mn^{++}.
Le remplacement d'un cation par un autre peut de plus changer la cinétique de coupure du DNA. En présence de Mg^{++}, ou en force ionique suffisante (0,1 M par exemple) la DNAse I ne coupe qu'une seule chaîne à la fois, ce qui se traduit par une cinétique de dégradation dite "à deux coups". En présence de Mn^{++}, Ca^{++}, Co^{++} ou du couple Mg^{++} + Ca^{++}, la coupure s'effectue simultanément sur les deux brins et la cinétique est alors une cinétique "à un coup" analogue à celle de la DNAse II.

Dans plusieurs de ces actions spécifiques des ions divalents, il est évidemment difficile de savoir si le phénomène doit être attribué à une modification de l'enzyme ou à celle du substrat. Dans un certain nombre de cas cependant, cette dernière éventualité est clairement démontrée, et il parait alors raisonnable d'admettre que les changements de conformation des acides nucléiques, produits par leur complexation avec des ions divalents perturbent le mécanisme de reconnaissance de l'enzyme.

3) Action mutagène

Sans vouloir établir ici un inventaire exhaustif de toutes les mutations provoquées par les ions divalents nous pouvons néanmoins citer :

- L'action de l'ion Mn^{++} sur une bactérie d'Escherischia Coli (Demerec, Janson, 1951) ou sur un bactériophage (Orgel er Orgel, 1965) provoque la multiplication du nombre des mutants par un facteur 100. Dans le cas du phage T_4, 194 mutants ont pu être isolés, dont certains seulement sont réversibles par des analogues de bases. Aucun "hot spot", c'est-à-dire région particulièrement susceptible de subir des mutations n'est décelée.

- L'obtention de la mutation "petite" chez la levure, par des ions divalents comme Cu^{++}, Co^{++}, Ni^{++}, Mn^{++}, Cd^{++}, (Lindegreen, Nagai, Nagai, 1958 ; Yanagishima, 1957 ; Nakamura, 1961).

- Cu^{++} est également capable d'induire des mutations dans des bactéries comme Bacillus Subtilis (Weed et Longfellow, 1954 ; Clowes et Rowley, 1955 ; Hirsh, 1961 ; Weed, 1963).

On constate pour le DNA de la souche mutante une composition en bases très différente de celle de la souche sauvage.

Dans le cas de la mutation "petite" de la levure citée précédemment, l'analyse comparative des compositions en bases des DNA mitochondriaux de la souche "petite" et de la souche sauvage n'a pas été faite pour des mutants induits par Cu^{++}. Par contre, cette analyse effectuée sur des mutants induits par des colorants d'acridine ou du bromure d'éthidium montre des modifications importantes de la composition en bases des DNA mitochondriaux de la souche "petite" par rapport à la souche sauvage.

On constate donc qu'un ion métallique comme l'ion cuivrique est capable d'introduire des modifications importantes dans le genome de certains organismes comme les levures ou les bactéries. Il est raisonnable de supposer que c'est la fixation de l'ion au niveau du DNA qui amène l'enzyme de replication à des erreurs de lecture susceptibles de se traduire par l'addition ou la délétion de certaines bases, modifications interprétées à l'heure actuelle comme un déplacement du cadre de lecture de l'enzyme de replication (Frameshift mutation).

C'est pourquoi il nous a semblé intéressant d'essayer de déterminer la manière dont un ion métallique comme le cuivre est capable de se fixer au DNA (sites de fixation, nature de la liaison Cu^{++} - DNA sur les sites de fixation ....)

Notre étude a essentiellement portée sur l'ion cuivrique Cu^{++}, mais nous verrons par la suite que le modèle adopté pour la fixation de Cu^{++} sur le DNA semble valable pour un grand nombre d'ions divalents.

La mutation "petite" observée chez Saccharomyces cerevisiae est une mutation cytoplasmique. Elle est caractérisée par une modification du DNA mitochondrial, entrainant chez la levure l'absence de synthèse de plusieurs enzymes respiratoires.

B) INTERACTIONS Cu^{++} - DNA

Nous effectuerons en introduction une mise au point rapide des principaux résultats expérimentaux connus au moment où nous avons entrepris ce travail. La deuxième partie rassemblera l'ensemble de nos résultats expérimentaux obtenus sur des polyribonucléotides et des polydésoxyribonucléotides de synthèse ainsi que sur différents DNA.
Dans la dernière partie de ce chapitre enfin, nous proposerons un modèle pour la fixation du cuivre sur les acides désoxyribonucléiques et nous le confronterons à l'ensemble des résultats publiés jusqu'à présent dans ce domaine.

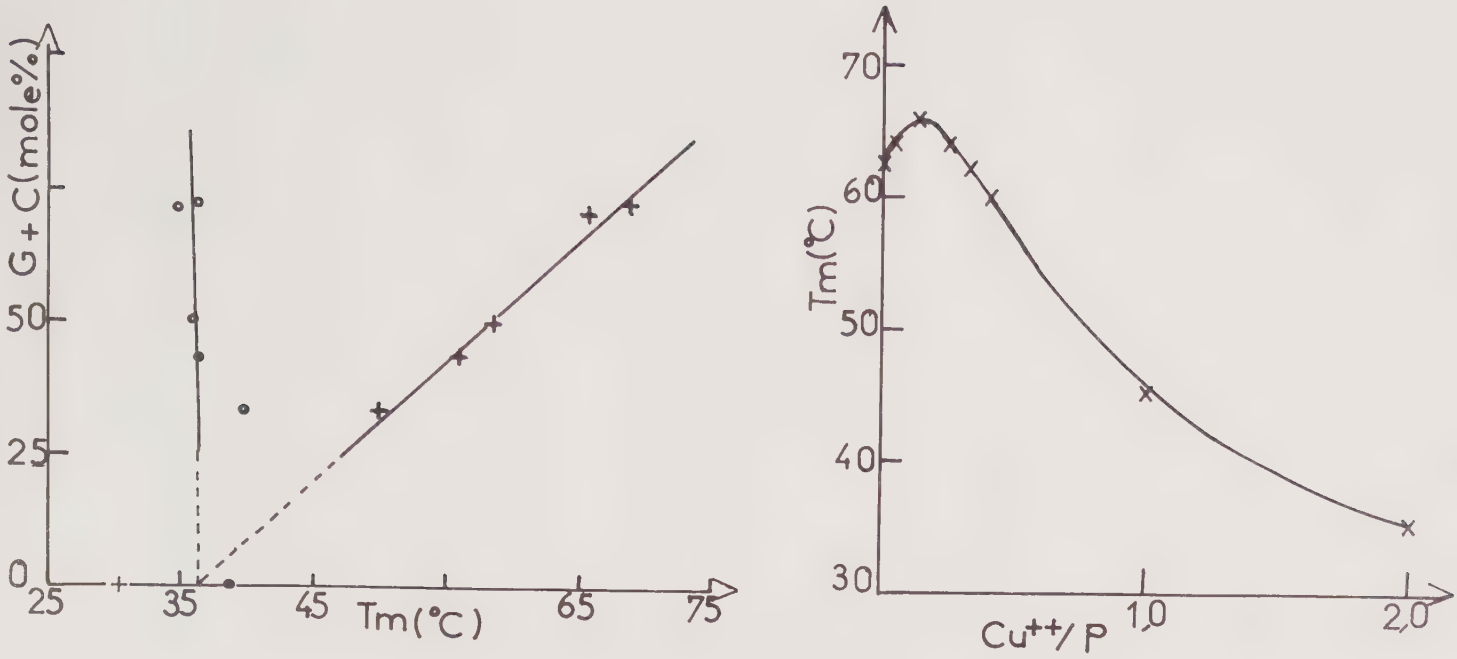
1) Introduction : mise au point bibliographique

La fixation du cuivre sur l'acide désoxyribonucléique a été étudiée par un grand nombre d'auteurs. On peut classer leurs résultats en deux groupes principaux : a) ceux obtenus à faible force ionique (par exemple 5.10^{-3} M NO_3Na) ; b) ceux obtenus à force ionique plus élevée (généralement 0,1 M).

a) A faible force ionique et à froid les ions cuivriques se fixent sur les phosphates. Le chauffage d'une telle solution de DNA, qui s'accompagne d'une disparition locale de la structure secondaire, rend accessibles les bases sur lesquelles vient alors se fixer une certaine quantité d'ions cuivriques. Cette fixation sur les bases est mise en évidence par la modification du spectre ultraviolet du DNA.

Plusieurs auteurs étudient dans ces conditions, les courbes de fusion du DNA en présence de cuivre (Eichhorn, Clarck, Becker, 1966 ; Venner et Zimmer, 1966 ; Hiai, 1965 ; Coates et Jordan, 1965 ; Yatsimirskii et Kriss, 1966). Ils constatent que la T_m d'un DNA donné varie en fonction de la quantité de cuivre ajouté et que cette variation ne se fait pas toujours dans le même sens lorsque l'on augmente la quantité de Cu^{++}. Pour de faibles quantités d'ions cuivriques la valeur de la T_m est augmentée. Pour des quantités plus élevées cette valeur diminue et tend vers un minimum. Ces auteurs constatent également, que lorsque l'on utilise des DNA de composition en bases différente,

Fig 1


+ sans Cu++
° avec Cu++
G+C(mole%)
50
25
0
25
35
45
Tm(°C)
65
75
Tm(°C)
70
60
50
40
30
Cu++/P
1,0
2,0

la destabilisation observée en présence d'une quantité importante d'ions Cu^{++} est d'autant plus grande que le DNA utilisé est riche en paires GC.

Nous nous sommes permis de reproduire sur la figure 1 les résultats obtenus par Venner et Zimmer (1966). L'examen de la figure amène une constatation immédiate : en présence d'une quantité suffisante d'ions Cu^{++}, les valeurs des T_m mesurées pour des DNA de composition en bases différente deviennent i) très proches les unes des autres ii) très proches également de la température de fusion mesurée pour un dAT dans les mêmes conditions.

Notons encore que tous les auteurs cités précedemment n'ont pas trouvé l'augmentation de la T_m du DNA, en présence de petites quantités de Cu^{++}.

Le DNA fondu en présence d'ions cuivriques possède une hyperchromicité supérieure à celle obtenue en l'absence de ces ions. Sa constante de sédimentation est considérablement augmentée et sa viscosité diminue fortement (Hiai, 1965).

La destabilisation observée est liée spécifiquement à la présence de l'ion cuivrique. Ivanov et Minchenkova (1965 - 1967) montrent que l'addition d'un réducteur dans le milieu, en réduisant l'ion cuivrique en ion cuivreux provoque une augmentation de la T_m et de profonds changements d'activité optique (spectre U.V).

On peut régénérer le DNA de départ en enlevant les ions Cu^{++}, soit par dialyse, soit par addition d'EDTA (Hiai, 1965), soit encore en augmentant la force ionique. Le DNA ainsi "renaturé" possède les mêmes caractéristiques spectrales, la même constante de sédimentation, et la même viscosité que le DNA de départ.

Travaillant dans les mêmes conditions de force ionique, Bryan et Frieden (1967) ont montré que le spectre du DNA est modifié à la température ambiante, par l'addition d'ions cuivriques en quantité suffisante. Ces auteurs observent une augmentation de l'absorption à 260 nm et parallèlement, la diminution de la viscosité et l'augmentation de la constante de sédimentation.

La fixation sur les bases est donc possible sans chauffage préalable dans le cas du DNA. Elle est rendue très facile pour les polynucléotides de synthèse : une étude d'Eichhorn et Tarien (1967) montre qu'il y a fixation du cuivre sur le poly-rA, le poly-rC et le poly-rI. Dans le cas des doubles hélices de poly-r(I+C) ou de poly-r(A+U), on observe une hyperchromicité du même ordre qu'avec le DNA, et celle-ci est en partie réversible par augmentation de la force ionique.

b) En opérant en 0,1 M ClO_4Na, à 20°C Ropars (1966), dans une étude menée par résonance paramagnétique électronique montre que dans ces conditions la fixation sur les phosphates est négligeable, mais que par contre une certaine quantité d'ions cuivriques se fixe sur les bases sans qu'il soit nécessaire d'élever la température.

L'ensemble de ces résultats fait apparaitre deux sites de fixation possibles pour Cu^{++} sur le DNA :

- les phosphates du polyanion tout d'abord : ceux-ci ne sont accessibles qu'à faible force ionique. Dans ces conditions les groupements phosphates restent suffisamment négatifs pour attirer par simple effet électrostatique les cations divalents présents dans la solution. L'utilisation d'une force ionique élevée, en écranant les charges portées par les phosphates, empêche ce type de fixation.
- le deuxième type de sites est constitué par les bases du DNA. Son existence est démontrée à faible force ionique (Bryan et Frieden, 1967) ; à force ionique élevée, elle semble malgré les résultats de Ropars (1966) contestée ou ignorée par certains auteurs.

Considérée du point de vue biologique, une simple fixation de Cu^{++} sur les phosphates à la manière d'un cation compensateur ne présente qu'un intérêt limité : le phénomène purement électrostatique existe avec les ions compensateurs classiques comme Na^+. L'action biologique du cuivre au niveau des acides nucléiques ne se situe probablement pas à ce niveau. Des ions comme Na^+, K^+, Mg^{++}, incapables d'une quelconque fixation sur les bases du DNA n'ont (pour ne considérer que la mutagénèse)

aucun pouvoir mutagène connu. Il semble d'ailleurs plus logique de rechercher l'origine de la mutagénicité du cuivre au niveau d'une interaction de l'ion avec les bases du DNA. Le premier problème qui se pose alors est de savoir quelles sont les bases qui dans un DNA natif sont susceptibles de fixer l'ion cuivrique.

Pour tenter de résoudre ce problème, nous avons étudié la stoechiométrie des complexes de Cu^{++} avec différents polyribonucléotides et polydésoxyribonucléotides de synthèse ainsi qu'avec des DNA de composition en bases différente, et ce dans des conditions de force ionique (0,1 M ClO_4Na) où toute fixation sur les phosphates est exclue. Cette partie de notre travail a été faite pour l'essentiel par polarographie.
En utilisant ensuite différentes techniques telles que, spectrophotométrie différentielle, dichroïsme circulaire, diffusion de la lumière, mesures hydrodynamiques (sédimentation et viscosité) nous avons essayé de caractériser le complexe Cu^{++} - DNA en force ionique élevée (0,1 M ClO_4Na) et de le comparer au complexe Cu^{++} - DNA à faible force ionique.

2) L'étude du complexe Cu^{++} - DNA

a) Matériel

Les polyribonucléotides utilisés nous ont été fournis par Biopolymers. Nous avons utilisé : poly-rA, poly-rU, poly-rG, poly-rC, poly-rI.
Le poly-r(A+U) a été préparé d'après la méthode décrite par Felsenfeld et Rich (1957).
Les polydésoxyribonucléotides sont des produits Miles : du poly-dAT d'une part et du poly-dGdC d'autre part pour lequel l'analyse de la composition en bases nous donne 48 % de cytosine contre 52% de guanine.
Les DNA ont été préparés au laboratoire par la méthode classique au détergent de Kay, Simmons et Dounce (1952).
Nous avons utilisé des échantillons d'origines diverses :

- deux DNA de thymus de veau V320 ($M=6,8.10^6$; $\varepsilon_p=6800$)
  V309 ($M=6.10^6$ ")
  Les contenus en protéines de ces deux DNA étaient compris entre 0,2 et 0,5%.
- Un DNA de Micrococcus lysodeikticus
- Un DNA d'Escherichia Coli

Les compositions en bases exprimées par le rapport A+T/G+C sont respectivement de 1,38 pour le thymus, 1,01 pour E. Coli et 0,41 pour Micrococcus lysodeikticus.
Le perchlorate de sodium est un produit Fluka.
Les autres solutions salines utilisées sont préparées à partir de produits Merck sans purification supplémentaire.
Le DNA est dissous en 10^{-3} M ClO_4Na et les solutions sont ensuite ajustées à la force ionique désirée par addition d'une solution concentrée de perchlorate. Sauf indications contraires, toutes nos mesures ont été effectuées à un pH compris entre 5,5 et 5,7 et à une température de 20°C.

b) Méthodes

Polarographie

Le polarographe utilisé est un "Atlas-Tastpolarograph". Les polynucléotides ainsi que les différents DNA (3.10^{-4} M en P) sont en milieu ClO_4Na à différentes forces ioniques (0,1 M ; 0,2 M ; 0,3 M). Tous nos dosages sont effectués en présence de Triton X-100 comme agent tensioactif (0,002%) dans une cellule thermostatée par circulation liquide.

Toutes les mesures sont ensuite effectuées sous atmosphère d'argon, les solutions à étudier étant préalablement débarrassées de toute trace d'oxygène susceptible de perturber le polarogramme dans la région du potentiel redox du cuivre par barbotage de ce même gaz.

A 10 ml de la solution de polynucléotide sont ajoutées à la microseringue ou à la lambda-pipette, des quantités croissantes d'une solution concentrée de cuivre (l'effet de dilution est négligeable dans nos conditions opératoires). Après chaque addition d'ion cuivrique nous enregistrons le polarogramme.

Les concentrations de Cu^{++} ($CuSO_4$) vont de 1.10^{-5} M à $3,5.10^{-4}$ M. Dans ce domaine, en l'absence de DNA ou de polynucléotide, le courant de diffusion i_D varie linéairement avec la concentration en substance réductible. Son expression nous est donnée par l'équation d'Ilkovic :

$$i_D = 7,08.10^4.n.m^{2/3}.D_o^{1/2}.C_o.t^{1/6}$$

où i_D est exprimé en ampères,

m représente le débit du capillaire en g/s (grammes par seconde)

t la durée de vie d'une goutte en secondes,

D_o le coefficient de diffusion de l'espèce réductible en $cm^2\ s^{-1}$,

C_o la concentration de l'espèce réductible.

Lors de la polarographie des solutions contenant cuivre et polynucléotides (ou DNA), nous confondrons le courant de diffusion i_D comme dû aux seuls ions Cu^{++} libres. Le cuivre lié au DNA ayant le même coefficient de diffusion que ce dernier sa contribution au courant i_D est négligée.

En effet la valeur approximative de D_o pour un polynucléotide

est de l'ordre de 5.10^{-7} $cm^2.s^{-1}$ et pour le DNA d'environ 10^{-8} $cm^2.s^{-1}$. Elle est pour l'ion Cu^{++} d'environ 10^{-5} $cm^2.s^{-1}$. Dans ces conditions la contribution au courant de diffusion du cuivre lié au polymère atteint 2 à 5% de la valeur totale de i_D.

En présence de DNA, la viscosité du milieu augmente considérablement : le coefficient de diffusion des ions Cu^{++} et par suite i_D vont donc diminuer, mais la viscosité microscopique du solvant qui intervient dans le phénomène n'est pas calculable à partir de η. Expérimentalement, nous avons fait la correction nécessaire en mesurant les valeurs de i_D pour l'ion Mn^{++}, non complexé avec le DNA en 0,1 M ClO_4Na, en présence et en l'absence du polymère. La présence de DNA se traduit par une diminution de 7% du courant de diffusion. Nous avons systématiquement appliqué cette correction au dosage des ions Cu^{++} libres en présence de DNA.

Nous avons pour représenter nos résultats, utilisé la représentation classique de Scatchard. Si nous considérons que la fixation des ions Cu^{++} se fait sur des sites indépendants, nos résultats peuvent être représentés par l'isotherme :

$$\frac{r}{A_o} = k(n-r)$$

A_o est la concentration des molécules libres en équilibre avec les molécules liées.

r est le nombre de moles de Cu^{++} liées par atome-gramme de phosphore.

n est le nombre de sites identiques homogènes par mole de phosphore.

k est la constante d'association intrinsèque commune à tous les sites.

En portant r/A_o en fonction de r, on trouve des droites de pente -k qui coupent l'axe des abscisses pour r = n.

Mesures d'Absorption : Spectres différentiels

On a utilisé un spectrophotomètre Cary 15. On utilise des cuves de 10 mm d'épaisseur. Les deux cuves contenant des solutions dans $NaClO_4$ de DNA de même densité optique, sont placées l'une sur la voie mesure, l'autre sur la voie référence. Dans la première, on ajoute à la microseringue des quantités croissantes d'une solution concentrée de $CuSO_4$ dans $NaClO_4$. Dans la seconde on ajoute les mêmes quantités de solvant.

On a vérifié d'autre part l'absorption de $CuSO_4$ aux concentrations utilisées. Pour compenser cette absorption qui n'est plus négligeable à des longueurs d'onde inférieures à 260 mμ , toute une série d'expériences a été menée à l'aide de quatre cuves de 10 mm.

Les deux premières contenant la solution de DNA sont placées comme plus haut : les deux autres contenant du solvant sont placées l'une sur la voie mesure, l'autre sur la voie référence. Dans celle-ci on ajoute une quantité de cuivre correspondant pour chaque chaque valeur de cuivre total ajouté,à la quantité de cuivre libre dans la solution de DNA qui avait été déterminée précédemment par polarographie. Dans la cuve placée sur la voie mesure, on ajoute des quantités identiques de solvant.

Soient (Cu), (Cu_0), (Cu_L) les concentrations respectives en cuivre total, cuivre libre et cuivre lié.

Soient de même (P), (P_0) et (P_L) les concentrations exprimées en moles de nucléotide du polymère total, du polymère non lié à du cuivre (ou libre) et du polymère lié au cuivre.

Soient enfin ε_0 et ε_L les coefficients d'extinction respectifs du nucléotide libre d'une part et du nucléotide lié au cuivre d'autre part.

La valeur de la densité optique (D.O.) nous est donnée par :

$$D.O. = \varepsilon_L(P_L) + \varepsilon_0(P_0)$$

ou encore :

$$D.O. = \varepsilon_0(P) = \varepsilon_0[(P_0) + (P_L)]$$

Les spectres différentiels nous permettent de déterminer $\Delta(D.O.)$.

$$\Delta(D.O.) = (\varepsilon_L - \varepsilon_0)(P_L) = (\varepsilon_L - \varepsilon_0)(Cu_L) = (\varepsilon_L - \varepsilon_0)((Cu) - (Cu_0)) \quad (1)$$

La mesure de Δ(D.O.) à 280 mμ, c'est-à-dire dans une région où seuls absorbent nucléotides et nucléotides liés au cuivre nous fournira donc une grandeur proportionnelle à la quantité de Cu^{++} lié.

Envisageons le cas d'une série homogène de sites sur le DNA. En considérant que la fixation des ions Cu^{++} se fait sur des sites indépendants, nous pouvons écrire :

$$r/(Cu_0) = k(n - r) \qquad (2)$$

où (Cu_0) est la concentration de cuivre libre en équilibre avec le cuivre lié, r est le nombre d'ions cuivre par atome-gramme de P, n est le nombre de sites identiques homogènes par mole de phosphore, k est la constante d'association intrinsèque commune à tous les sites.

$$(Cu_L) = rP \qquad (Cu) = (Cu_0) + r(P)$$

$$r = k(n - r)((Cu) - r(P))$$

posons $y = (Cu)/(P)$

$$(r/k(P)) = (n - r)(y - r)$$

$$r^2 - r\{n + y + (1/k(P))\} + ny = 0$$

$$2r = n + y + (1/k(P)) \pm \{(n + y + (1/k(P))^2 - 4\,ny\}^{1/2} \qquad (3)$$

En combinant les equations (1) et (3) on obtient finalement la relation entre Δ(D.O.) et les paramètres caractéristiques de la fixation.

$$\Delta(D.O.) = (\varepsilon_L - \varepsilon_0)\frac{(P)}{2}\left[n+y+\frac{1}{k(P)} \pm \left\{\left(n+y+\frac{1}{k(P)}\right)^2 - 4\,ny\right\}^{1/2}\right] \qquad (4)$$

La courbe Δ(D.O.) en fonction de y (ou de (Cu)) tend vers la valeur limite $(\varepsilon_L - \varepsilon_0)n(P)$ quand $y \to \infty$.

Pour les faibles valeurs de y (ou de (Cu)) la courbe peut être confondue avec la droite d'équation

$$\Delta(D.O.) = (\varepsilon_L - \varepsilon_0)(k\,n(P)/1+kn(P))(Cu) \qquad (5)$$

Lorsque $Kn(P) \gg 1$ on peut calculer la quantité (Cu_L) en comparant les équations (1) et (5). A chaque valeur expérimentale de Δ(D.O.) correspond un point sur la droite dont l'abscisse est (Cu_L). Par ailleurs l'intersection de cette droite avec l'asymptote donne n. On peut ainsi calculer tous les paramètres de la formation du

Tableau

λ nm	220	230	240	250	260	270	280	290
ε_{AT}	0,50	0,32	0,56	0,89	1,00	0,82	0,34	0,06
β_{GC}	0,72	0,56	0,68	0,62	0,87	1,00	0,81	0,31
β_{AT}/β_{GC}	0,690	0,570	0,820	1,430	1,140	0,820	0,419	0,190
$\beta_{GC}/\varepsilon_{AT}$	1,440	1,750	1,219	0,699	0,870	1,219	2,380	5,260

complexe et tracer les isothermes.
Dans le cas général (et en particulier pour le cas du cuivre) l'intersection de la droite (5) et de l'asymptote se produit pour

$$y = n + (1/k(P))$$

et il n'est plus possible de tracer les isothermes $r/(Cu_0) = k(n-r)$.

L'exploitation rigoureuse des résultats de spectrophotométrie différentielle ne peut se faire que si les valeurs de k et de n sont connues d'après une autre technique.
Nous montrons qu'il est possible dans ce cas d'étalonner les spectres différentiels pour une valeur de la force ionique, et de les utiliser ensuite comme mesure directe de la formation du complexe.

Courbes de Fusion

Analyse de Felsenfeld

Les courbes de fusion sont réalisées sur le même spectrophotomètre Cary 15. Dans le compartiment de mesure est monté un support de cuve dans lequel un thermostat (Tamson) fait circuler du glycol. On opère en plaçant sur la voie mesure et sur la voie référence la même solution de DNA, celle de la voie mesure étant seule soumise à l'augmentation de température. Dans le cas des courbes de fusion du DNA en présence de cuivre, on ajoute la même quantité de cuivre dans les deux cellules. On obtient donc un spectre différentiel : DNA natif-DNA dénaturé. Pour la mesure des températures, on utilise un couple BTE-CTE qui plonge dans la cellule de mesure. La valeur de la force électromotrice aux bornes du couple est mesurée par une méthode d'opposition. Chaque température est ainsi déterminée avec une précision supérieure à 0,1°C.
La montée en température se fait par paliers successifs espacés de 1à 2°. Une fois la cuve à une température stable, on enregistre le spectre U.V entre 340 et 220 nm.
On peut ainsi mesurer la température de transition d'un échantillon de DNA à plusieurs longueurs d'onde. On constate une dispersion de la T_m qui dépend de l'hétérogénéité de composition du DNA. Cette dispersion de T_m est due au fait que la

contribution des paires A-T et G-C au changement d'absorption au cours de la dénaturation est différent suivant la longueur d'onde d'observation. On peut exploiter ces observations en admettant une relation linéaire du type :

$$\Delta A(\lambda,T)=\beta_{AT}(\lambda,X_{AT})f_{AT}(T)+\beta_{GC}(\lambda,X_{GC})f_{GC}(T)$$

où $\Delta A(\lambda,T)$ = variation de D.O. à partir d'une température donnée,
X_{AT} et X_{GC} = proportion des paires A-T et G-C dans le DNA natif,
β_{AT} et β_{GC} = fonctions arbitraires de λ et de X,
f_{AT} et f_{GC} = fraction des paires A-T et G-C dénaturées à la température T.

Connaissant β_{AT} et β_{GC} il est possible d'obtenir expérimentalement les valeurs de f_{AT} et f_{GC} à différentes températures et de tracer ainsi les courbes de fusion correspondantes aux paires A-T et G-C.

Dans notre travail nous avons utilisé les valeurs de β_{AT} et β_{GC} calculées par Felsenfeld dans le cas d'un DNA de thymus de veau. Le calcul de f_{AT} et f_{GC} a été effectué par une méthode graphique.
Les valeurs de β_{AT} et β_{GC} sont reproduites dans le tableau ci-contre.

Courbes de Fusion à 260 nm

Pour ces courbes de fusion à longueur d'onde fixe, nous avons utilisé un spectrophotomètre DB Beckman à l'intérieur duquel était placé un bloc porte-cuves à chauffage électrique. Ce chauffage pouvait être programmé de façon à obtenir une montée en température variant linéairement avec le temps.
On enregistre alors sur un enregistreur XY la variation de densité optique en fonction de la température, température mesurée à l'intérieur de la cuve soit par une sonde de platine, soit par un thermocouple classique.

Dichroïsme Circulaire

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été faites à l'aide d'un dichrographe II "Roussel-Jouan". Nous avons exprimé sur les différentes figures la différence d'absorption dichroïque $\Delta\varepsilon = \varepsilon_g - \varepsilon_d$ en fonction de la longueur d'onde λ.

ε_g et ε_d représentent les coefficients d'extinction moléculaire des lumières gauche et droite.

Constantes de Sédimentation

Les constantes de sédimentation sont mesurées au moyen d'une ultracentrifugeuse Spinco modèle E munie d'une optique par absorption.

Viscosité

Les viscosités sont mesurées avec un viscosimètre à rotation (Kranig) suivant Zimm et Crothers. Au gradient de vitesse d'environ 1 seconde^{-1} auquel on travaille, on peut admettre que l'effet de viscosité non newtonienne est négligeable et que par conséquent en extrapolant à concentration nulle les valeurs de η_{sp}/c on obtient bien la viscosité intrinsèque(η) à $\begin{matrix} G = 0 \\ c = 0 \end{matrix}$

Diffusion de la Lumière

L'expression générale de l'intensité de la lumière diffusée dans une direction faisant un angle θ avec la lumière incidente peut être mise sous la forme ci-dessous dans le cas de molécules ayant au moins une dimension L non négligeable par rapport à la longueur d'onde (L> λ/20)

$$R - R_0 = KC(M(1 + \cos^2\theta)\ P(\theta) + 2Bc)$$

où $K = 2\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2 \lambda^4 N_A$

et $R - R_0$ est la différence des rapports de Rayleigh de la solution et du solvant, $P(\theta)$ est une fonction sans dimension qui tend vers l'unité lorsque θ tend vers zéro (elle ne dépend que de la forme et des dimensions des molécules), B est le second coefficient du viriel qui tient compte des interactions entre les molécules en solution,

λ = longueur d'onde dans le vide de la lumière incidente,

n_0 = indice du solvant,

N_A = nombre d'Avogadro,

c = concentration de la solution (exprimée en g/ml),

M = masse moléculaire du polymère, et dn/dc = accroissement d'indice de réfraction de la solution en fonction de la concentration du polymère.

Calcul de la Masse et du Rayon de giration

Lorsque $\theta \to 0$ la courbe $Kc(R - R_0)$ en fonction de $\sin^2\theta/2$ tend vers une droite d'ordonnée 1/M dont la pente p est reliée au rayon de giration ρ de la molécule par la relation suivante :

$$\rho = (3p/16)^{1/2}$$

Calcul de la Masse par Unité de Longueur

Pour un mélange de bâtonnets homogènes rigides de longueur L, Holtzer a calculé le comportement asymptotique de $P(\theta)$ pour hL grand $(h = (4\pi/\lambda)\sin\theta/2)$

$$P(\theta)hL \to \infty = (\pi/hL) - (1/h^2L^2)$$

La quantité $K(R - R_0)/c = MP(\theta)$ tend vers l'expression $(\pi M/hL) - (2M/h^2L^2)$. Si on représente $hK(R - R_0)/\pi c$ en fonction de h, la courbe obtenue tend par valeurs inférieures vers une asymptote horizontale d'ordonnée M/L.

Cette extrapolation n'est valable que si hL est suffisamment grand ($hL \geq 2,5$). Dans les conditions habituelles h est limité par les valeurs de λ et θ ($h = 2,9 \times 10^{-3}$ Å pour $\lambda = 5460$ Å et $\theta = 150°$) et l'extrapolation ne sera valable que pour $L > 1400$ Å, c'est-à-dire pour des bâtonnets de DNA de masse $M > 280000$.

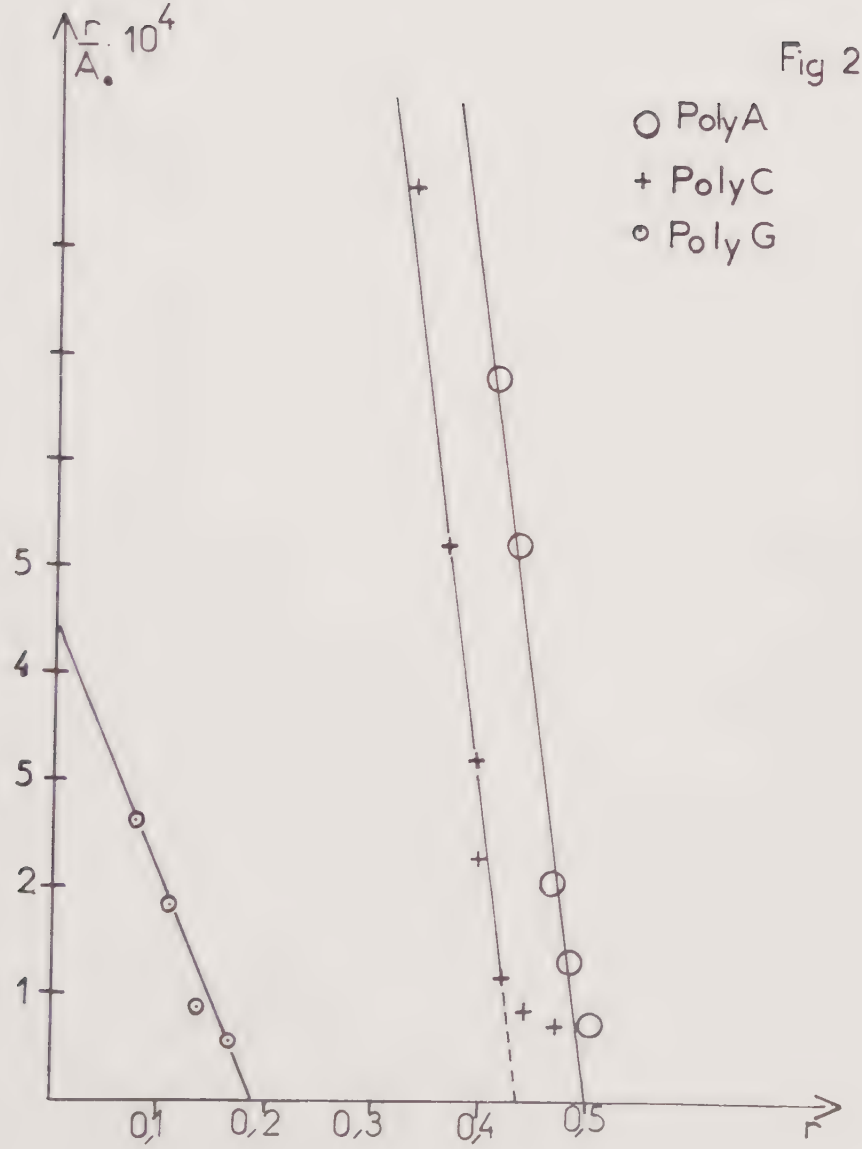


Fig 2
$\frac{r}{A_\bullet} \cdot 10^4$
PolyA
PolyC
PolyG
5
4
5
2
1
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
r

Tableau I

	Poly-rA neutre	Poly-rA acide	Poly-rC neutre	Poly-rC acide	Poly-rG	Poly-rU
n	0,5	0	0,5	0	0,25	0
k	8.10^5	-	8.10^5	-	$2,3.10^5$	-

c) Principaux résultats expérimentaux

Stoechiométrie (par polarographie)

α) Les polyribonucléotides

Pour une meilleure compréhension de nos résultats, nous préciserons rapidement les conditions expérimentales exactes utilisées pour chaque nucléotide ainsi que sa structure (double ou simple brin en particulier) dans ces conditions.

- Le poly-rA (acide polyriboadénylique) (c = $1,75.10^{-4}$ M en P en 0,1 M ClO_4Na)

Nous avons travaillé avec le poly-rA à deux pH différents

à pH 7,2 où dans nos conditions de force ionique le poly-rA est en simple brin (Warner et Breslow, 1958), tout en présentant une structure hélicoïdale (Brahms et Mommaerts, 1964).

à pH 5 : le poly-rA forme une double hélice dont les deux brins sont sans doute parallèles (Rich, Davies, Crick et Watson, 1961)

- Le poly-rC (acide polyribocytidilique) (c = $2,8.10^{-4}$ M en P en 0,1 M ClO_4Na)

Comme pour le poly-rA nous avons travaillé à deux valeurs du pH :

à pH 7,2 où nous sommes alors en présence d'un simple brin de structure hélicoïdale (Veis, 1970)

à pH 4 où le poly-rC se présente comme une hélice à double brin (Langridge et Rich, 1963)

- Le poly-rU (acide polyribouridilique) (c = 2.10^{-4} M en P en 0,1 m ClO_4Na) se présente comme une chaîne inorganisée (Veis, 1970)

- Le poly-rG (acide polyriboguanilique) (c = $4,2.10^{-4}$ M en P en 0,1 M ClO_4Na)

Sa structure est une structure hélicoïdale à plusieurs brins sans que l'on connaisse à l'heure actuelle le nombre exact de ceux-ci.

La figure 2 nous donne les diagrammes de Scatchard obtenus pour les différents polyribonucléotides. Nous avons rassemblé dans le tableau I les valeurs de n (nombre total de sites disponibles), ainsi que les valeurs de k (constante d'association) obtenues pour les différents polyribonucléotides. Nous constatons que dans nos

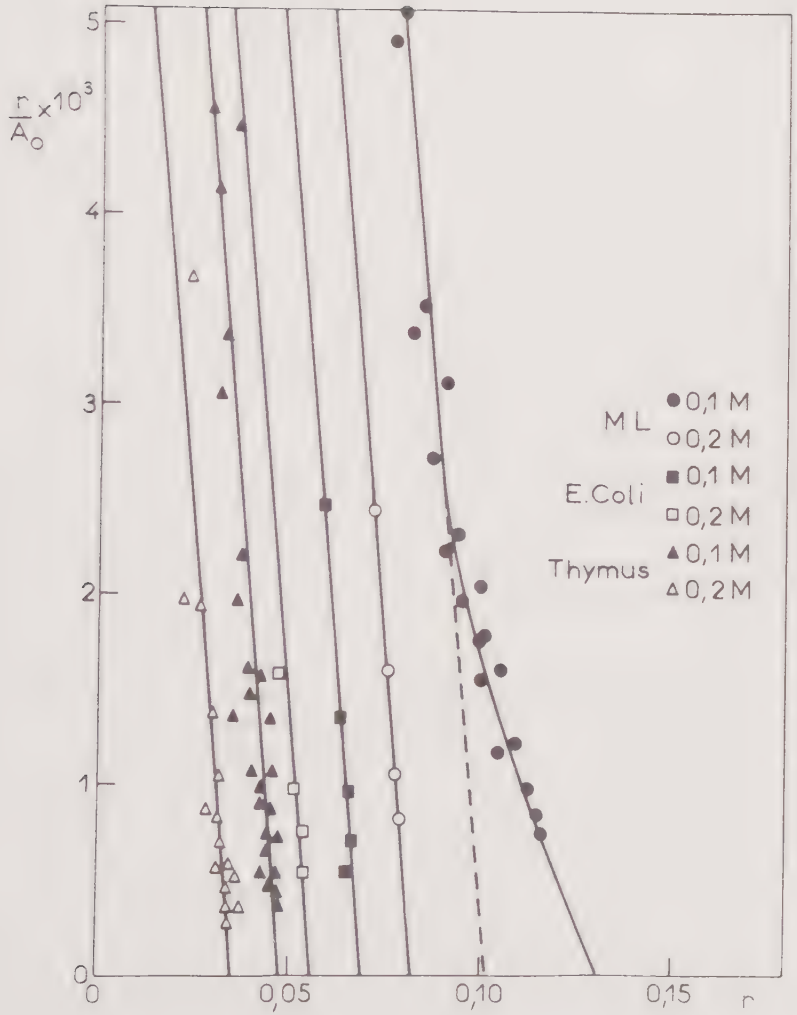

r/A₀ x10³
5
4
3
2
1
0
0
0,05
0,10
0,15
r
M L
E.Coli
Thymus
0,1 M
0,2 M
0,1 M
0,2 M
0,1 M
0,2 M

Fig 3.

Tableau II

ClO_4Na	Valeurs de n		
	Thymus	E. Coli	Micrococcus
0,1 M	0,048	0,069	0,12
0,2 M	0,037	0,055	0,083
0,3 M	0,037	0,055	0,083

conditions expérimentales, où la fixation de Cu^{++} sur les phosphates de la chaîne du polyion est impossible, on n'observe aucune fixation du cuivre sur le poly-rU. Ce résultat est en accord avec les résultats d'Eichhorn et Tarien,(1967), tout comme d'ailleurs la fixation de Cu^{++} sur les autres polyribonucléotides.

- Le poly-r(A+U) a été préparé d'après la méthode décrite par Felsenfeld et Rich (1957). Il ne nous a pas été possible dans les nombreuses expériences réalisées d'obtenir une stoechiométrie reproductible. Eichhorn et Tarien (1967) ont montré que l'addition de Cu^{++} au poly-r(A+U) détruit la structure hélicoïdale en double brin. A la force ionique utilisée (0,1 M) la cinétique de séparation des deux brins est lente et la quantité de Cu^{++} fixée doit dépendre étroitement du pourcentage de paires de bases non appariées dans le poly-r(A+U) au moment de la mesure. L'obtention d'un diagramme de Scatchard par polarographie nécessitant deux heures ou plus, on peut concevoir que dans ces conditions nos résultats n'aient pas été reproductibles. Il semble néanmoins que la valeur de n soit dans ce cas d'environ 0,25 Cu^{++}/P, ce qui correspondrait à la fixation de Cu^{++} sur un poly-rA en simple brin, le poly-rU présent dans le mélange n'étant pas susceptible de fixer l'ion cuivrique.

β) Les DNA

Nous avons porté sur la figure 3 les isothermes obtenus pour la fixation de Cu^{++} sur trois DNA de composition en bases différente. Le dosage à été effectué à deux forces ioniques. On constate :

- que quel que soit le DNA utilisé, et pour les différentes forces ioniques, on trouve sensiblement la même valeur de k ($2,3.10^{-5}$ 1/mole),ce qui correspond à une variation d'énergie libre d'environ 7,4 Kcal/mole traduisant l'affinité de la réaction.

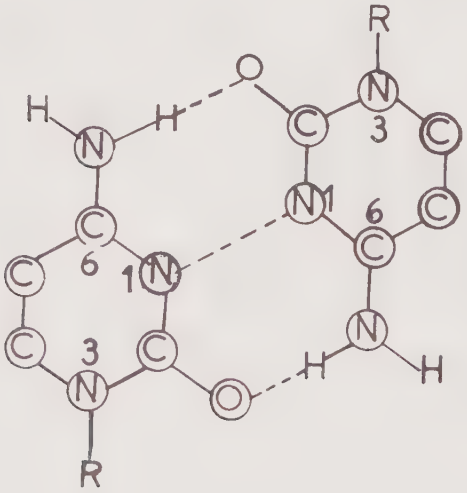
- Le nombre de sites (tableau II) diminue lorsque l'on passe de 0,1 à 0,2 M ClO_4Na. Cette diminution est probablement due au fait qu'en 0,1 M ClO_4Na il est encore possible de fixer quelques ions Cu^{++} au niveau des phosphates. La valeur de n

Tableau III

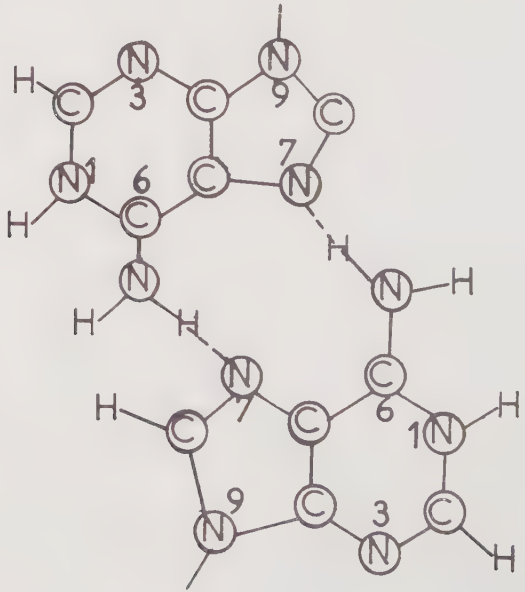
	DNA Thymus de Veau	DNA M. Lysodeikticus	DNA E. Coli
ApA, TpT	0.089, 0.091	0.019, 0.017	0.071, 0.076
CpA, TpG	0.080, 0.076	0.052, 0.054	0.071, 0.071
GpA, TpC	0.064, 0.067	0.065, 0.063	0.055, 0.056
CpT, ApG	0.067, 0.072	0.050, 0.049	0.055, 0.055
GpT, ApC	0.056, 0.052	0.056, 0.057	0.055, 0.054
GpG, CpC	0.050, 0.054	0.112, 0.113	0.056, 0.056
TpA	0.053	0.011	0.051
ApT	0.073	0.022	0.068
CpG	0.016	0.139	0.067
GpC	0.044	0.121	0.083

(D'après Josse, Kaiser et Kornberg)

Tableau IV

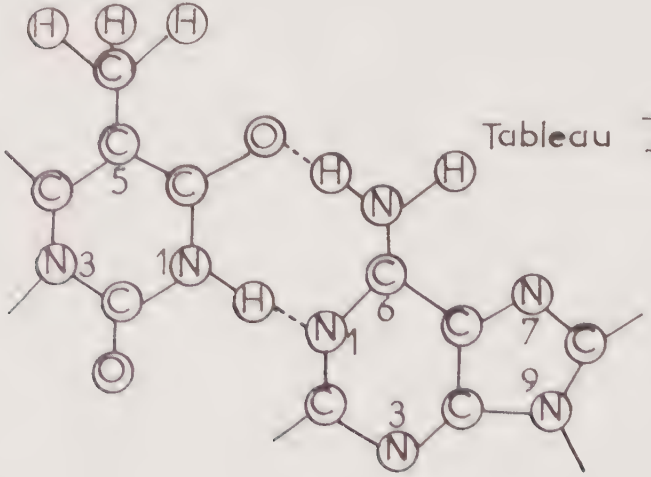


Poly C



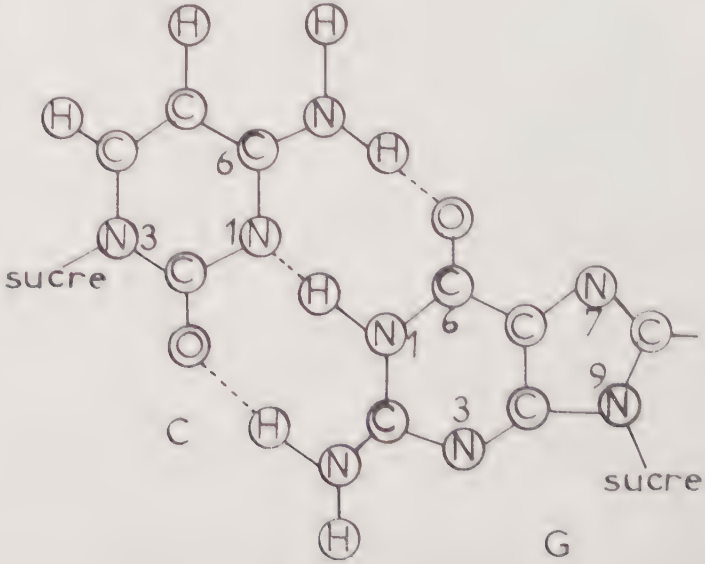
Poly A

Tableau IV (suite)



T

A



C

G

trouvée dans le cas du DNA de thymus de veau est par ailleurs très voisine de celle obtenue dans les mêmes conditions par Ropars et Viovy (1965) mais par résonance paramagnétique électronique.

- Ce nombre de sites varie avec la composition en bases du DNA considéré, et est d'autant plus grand que le DNA utilisé est riche en GC.

Nous avons reproduit dans le tableau III les résultats de Josse, Kaiser et Kornberg (1961) qui nous donnent pour les trois DNA utilisés les fréquences des plus proches voisins. Les pourcentages de deux paires GC superposées varient comme nos valeurs de n. Ces dernières leur sont sensiblement supérieures, mais il est possible que même en 0,2 ou 0,3 M il subsiste une faible fixation de Cu^{++} au niveau des phosphates.

Si nous rapprochons ces résultats de ceux obtenus sur les polyribonucléotides nous pouvons dire que :

i) dans une structure hélicoïdale à deux brins, les seules bases susceptibles de fixer Cu^{++} semblent être les guanines.

- Nous avons fait figurer dans le tableau IV les appariements entre bases complémentaires dans les polynucléotides à deux brins ainsi que les appariements entre bases complémentaires de Crick et Watson dans un DNA. On y constate que les atomes de la cytosine impliqués dans la liaison hydrogène sont les mêmes dans la paire **CC** du poly-rC acide que dans la paire GC du DNA. La fixation de Cu^{++} possible sur le poly-rC en simple brin, ne l'étant plus lorsque les cytosines sont appariées dans le poly-rC acide, il est raisonnable de penser que le site de fixation du cuivre sur la cytosine est constitué au moins pour partie par l'un ou plusieurs des atomes impliqués dans les liaisons hydrogène entre cytosines. Il est donc peu vraisemblable que sur un DNA natif du cuivre puisse se fixer au niveau des cytosines.

- La fixation du cuivre, possible sur un poly-rA simple brin, ne l'est plus lorsque ce poly-rA est en forme acide. Dans cette forme, l'azote 1 qui est protoné, l'azote 7 qui est engagé dans une liaison hydrogène et le groupement NH_2 porté par le carbone 6 sont inaccessibles au cuivre. Dans un poly-r(A+U) ou

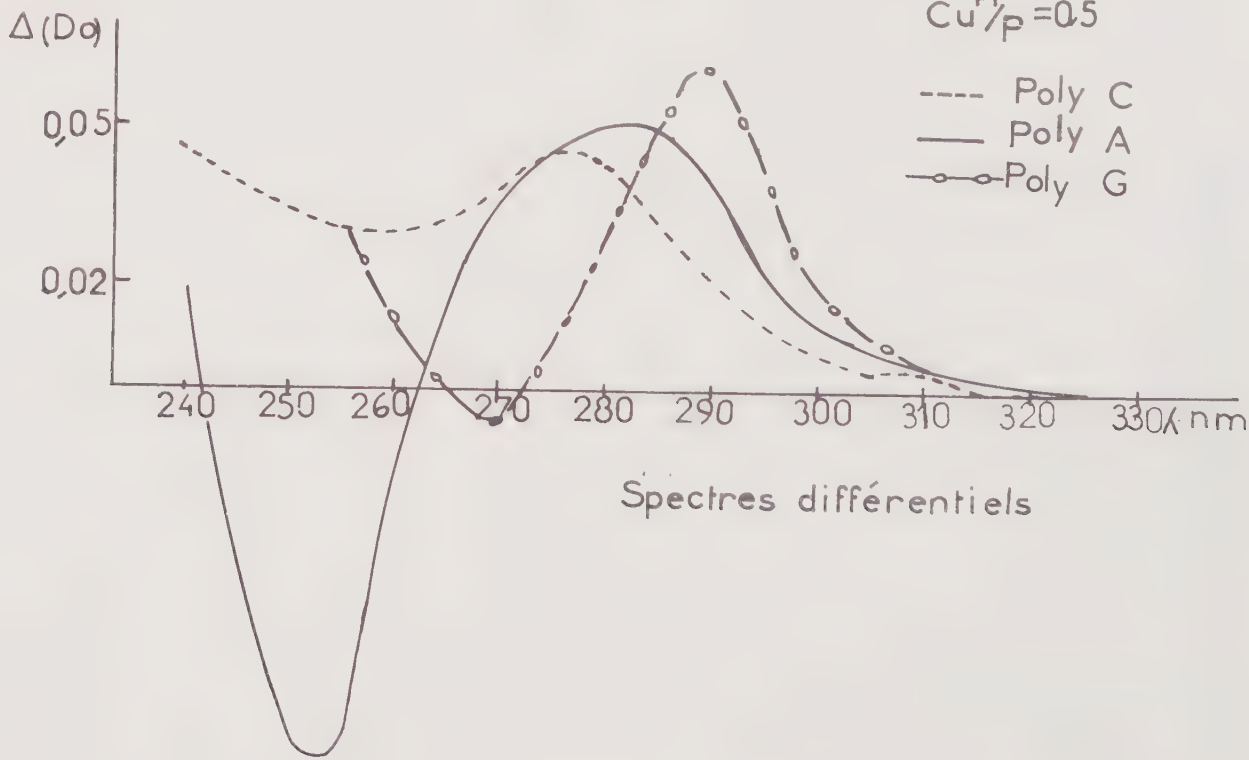
un DNA natif, l'azote 1 et le groupement NH_2 porté par le carbone 6 sont engagés dans des liaisons hydrogène. Dans ce cas la fixation du cuivre sur l'adénine n'est apparemment possible qu'après rupture des liaisons hydrogène, rupture se traduisant dans le poly-r(A+U) par sa séparation en deux brins, un brin de poly-rA et un brin de poly-rU, le poly-rA fixant alors Cu^{++} avec la stoechiométrie d'un poly-rA neutre.
Nous verrons par la suite que la séparation du poly-r(A+U) en deux brins sous la l'action de Cu^{++} ne se produit pas à force ionique élevée, lorsque toutes les adénines sont engagées dans des liaisons hydrogène (ce que l'on réalise en travaillant avec un léger excès de poly-rU par rapport au poly-rA), et qu'il n'y a donc aucune raison pour que la séparation des deux brins de la double hélice se produise dans un DNA au niveau des paires AT et fournisse ainsi des sites de fixation au cuivre.

- La fixation du cuivre ne se fait pas sur le poly-rU.
- L'ion cuivrique enfin se fixe sur le poly-rG et ce malgré sa structure hélicoïdale à plusieurs brins. En l'absence de la connaissance exacte de la structure du poly-rG, il est difficile de préciser la nature des sites de fixation du cuivre sur le polynucléotide. Remarquons néanmoins, que la constante de fixation du cuivre sur ce type de site est la même que celle du cuivre sur le DNA, et que la valeur trouvée pour n (0,25) dans le cas du poly-rG peut s'expliquer par la fixation de Cu^{++} entre deux guanines superposées.

ii) Les constantes de fixation sur un polynucléotide en simple brin sont nettement plus élevées que celles mesurées pour la fixation du cuivre sur un polynucléotide à plusieurs brins (poly-rG ou DNA).

iii) Cette dernière constatation permet de prévoir que l'ouverture de la double hélice du DNA par chauffage à une température supérieure à sa température de fusion entrainera une fixation supplémentaire de cuivre sur des bases comme les adénines ou les cytosines dégagées de leurs liaisons hydrogène. Si la quantité de Cu^{++} dans le milieu est inférieure au nombre de sites ainsi dégagés, on aura de plus un déplacement du cuivre des sites formés par les guanines, sur des sites d'affinité

Fig. 4



Spectres différentiels

supérieure : les adénines ou les cytosines d'un simple brin et éventuellement les guanines dans la mesure où la constante de fixation du cuivre sur une guanine non engagée dans une liaison hydrogène est supérieure à celle mesurée pour les sites formés de deux guanines superposées dans un DNA.

Spectrophotométrie différentielle

α) Les polyribonucléotides

Le spectre d'absorption ultraviolet des polyribonucléotides étant celui des bases puriques et pyrimidiques, toute modification de celles-ci provoquée par la fixation du cuivre va se traduire par une modification du spectre U.V du polynucléotide.
Ces spectres enregistrés suivant le processus décrit dans matériel et méthodes sont représentés sur la figure 4.
Pour chaque polyribonucléotide le rapport Cu^{++}/P est égal à 1.
Les solutions sont réalisées en 0,1 M ClO_4Na et les concentrations en polymère correspondent à des densités optiques allant de 1 à 2 aux longueurs d'onde des maxima d'absorption.
Le poly-rA et le poly-rC ne présentent de spectre différentiel que sous leur forme simple brin.
Le poly-rU ne présente aucune modification spectrale.
Il en est de même du poly-r(A+U) si l'on prend la précaution de travailler avec un léger excès de poly-rU dans le milieu, afin d'être sûr de l'appariement de toutes les adénines avec un uracyl. Dans le cas contraire, on observe pour le poly-r(A+U) mis en présence de cuivre l'apparition d'un hyperchromisme qui traduit le début de la désorganisation de la structure en double brin.
L'addition du cuivre sur le poly-rG se traduit par l'apparition d'un spectre différentiel.
L'ensemble de nos résultats est en accord avec les données obtenues par polarographie.

β) Le DNA

Les solutions de DNA utilisées sont à la concentration de 3.10^{-4} M en phosphate (D.O≃2 à 260 nm).

Fig. 5. Spectres différentiels du complexe DNA - Cu^{2+} : (1) Cu total exprimé en Cu/P = 0,025 ; (2) Cu total exprimé en Cu/P = 0,005 DNA V 320 en $NaClO_4$, 0,1 M ; D.O. ≃ 2.

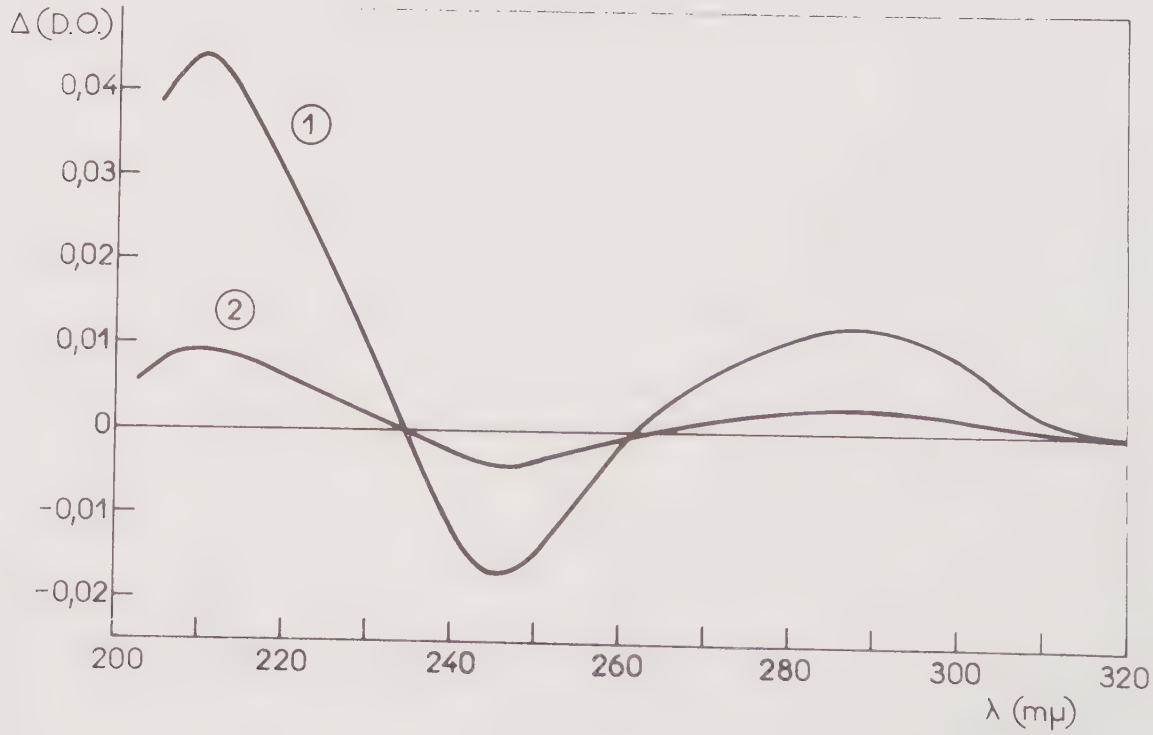


Fig 5

Fig. 6. Variation de la densité optique à 280 mμ en fonction de Cu total : (●) dans $NaClO_4$, 1 M ; (○) dans $NaClO_4$, 0, 1 M ; (□) dans $NaClO_4$, $5x10^{-3}$ M. DNA V 320 ; $D.O._{260} \sim 4$.

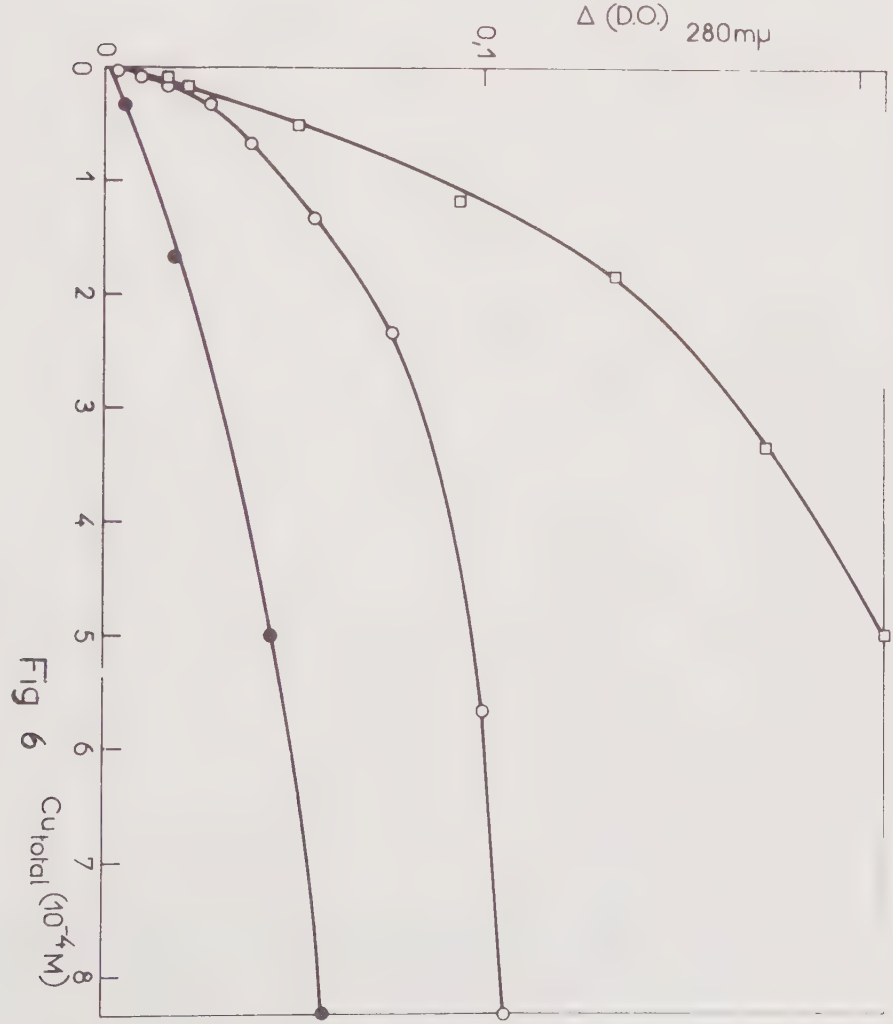


Fig 6

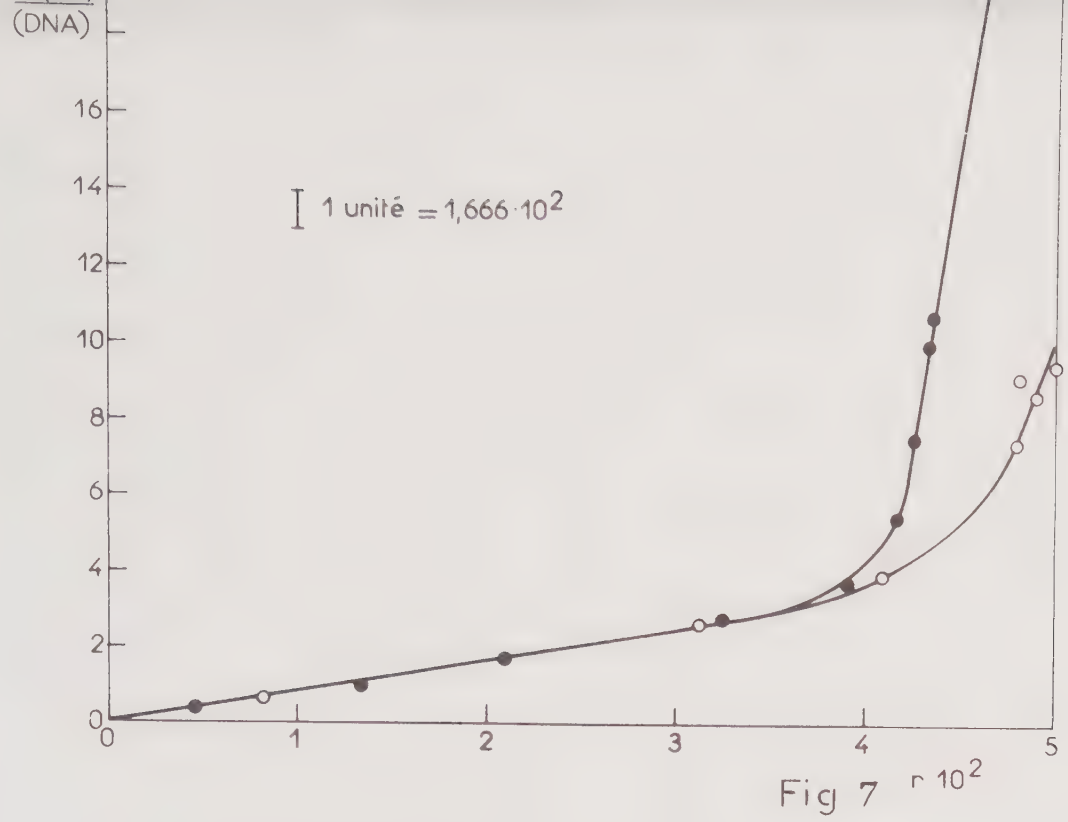


Fig. 7. Variation de la densité optique réduite Δ(D.O.)/(DNA) à 280 mμ en fonction de r : (●) DNA, 6×10^{-4} M en P ; (○) DNA, 3×10^{-4} M en P. DNA V 320, en $NaClO_4$, 0,1 M.

Nous avons utilisé dans certains cas pour mesurer Δ(D.O) à 280 nm des concentrations plus fortes de DNA (D.O≃4 à 260 nm). En mesurant Δ(D.O) à 280 nm, on travaille encore avec une largeur de fente raisonnable (<1mm). Dans ces conditions le taux de lumière parasite reste inférieur à 1%.

Les concentrations en ClO_4Na utilisées sont 1 M, 0,1 M et 5×10^{-3} M. Les concentrations en ions cuivriques varient de 1×10^{-6} M à 8×10^{-4} M.

En 0,1 M ClO_4Na les spectres différentiels observés (figure 5) présentent : un maximum mal défini entre 290 et 280 mμ ; un maximum bien défini vers 211 mμ ; un minimum à 245 mμ ; deux points isobestiques l'un à 261,5 mμ et l'autre à 235 mμ.

Nous avons porté sur la figure 6 la variation de D.O à 280 mμ en fonction de la quantité de cuivre total ajoutée au DNA.

Nous avons ensuite utilisé les valeurs de r et de k trouvées par polarographie pour calculer les quantités de cuivre libre et de cuivre lié au DNA correspondant à une quantité donnée de cuivre total.

Les valeurs de r ainsi calculées ont été portées en fonction de la variation de densité optique réduite Δ (D.O)/C à 280 mμ (figure 7).

Dans la première partie de la courbe, l'augmentation de D.O est proportionnelle à r. Il y a ensuite une rupture très nette de pente et une variation apparente plus forte de D.O avec r. Si on diminue la concentration en DNA de moitié (D.O≃2) on constate que la pente de la première droite reste la même mais que la pente de la deuxième droite diminue de moitié.

En opérant à des concentrations plus faibles de DNA, on arrive à obtenir un palier dans l'augmentation de D.O, malheureusement, les faibles variations de densité optique mesurées dans ces conditions ne permettent pas une détermination précise de ce palier.

Le fait que la densité optique à 280 mμ ne se stabilise pas lorsque Cu^{++} augmente est due à l'augmentation de l'intensité diffusée par la solution provenant de deux causes : (a) la distribution angulaire de la lumière diffusée change lorsque le DNA prend une configuration plus compacte sous l'influence de Cu^{++} (cf : résultat de diffusion de la lumière) ; (b) il peut se

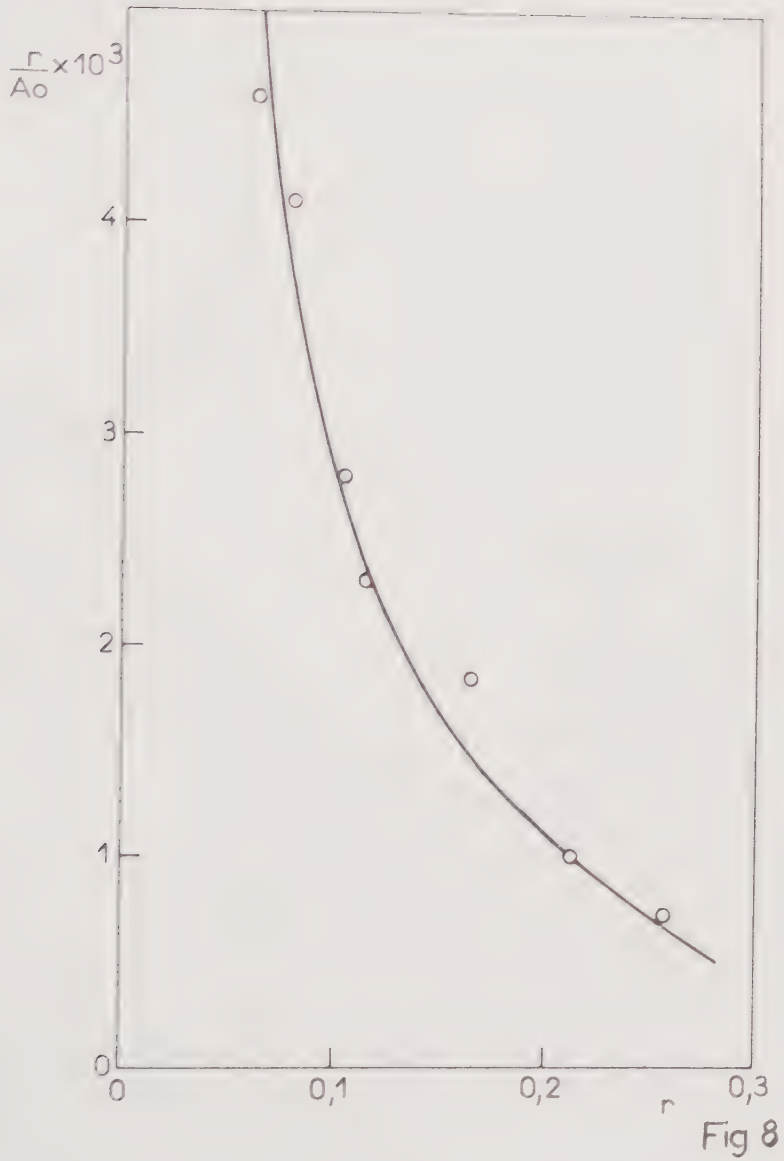


Fig. 8. Variation de r/A_o en fonction de r ($A_o = (Cu_o)$) en $5x10^{-3}$ M $NaClO_4$.

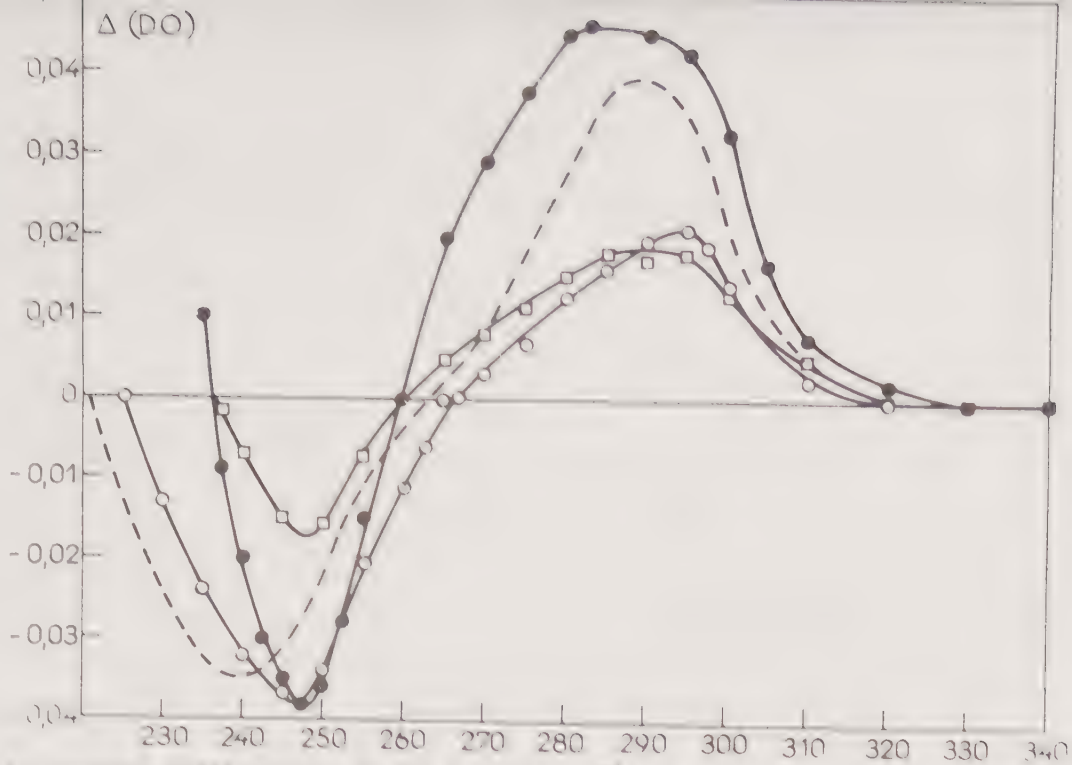


Fig 9

Fig. 9. Spectres différentiels du DNA V 320 (8×10^{-4} M) en 0,1 M $NaClO_4$: (●) avec Cu^{2+} ; (○) avec Ni^{2+} ; (□) Fe^{2+} (--) spectre différentiel calculé de la paire GC protonée. Dans tous les cas la concentration totale de l'ion est équivalente à la molarité en phosphore.

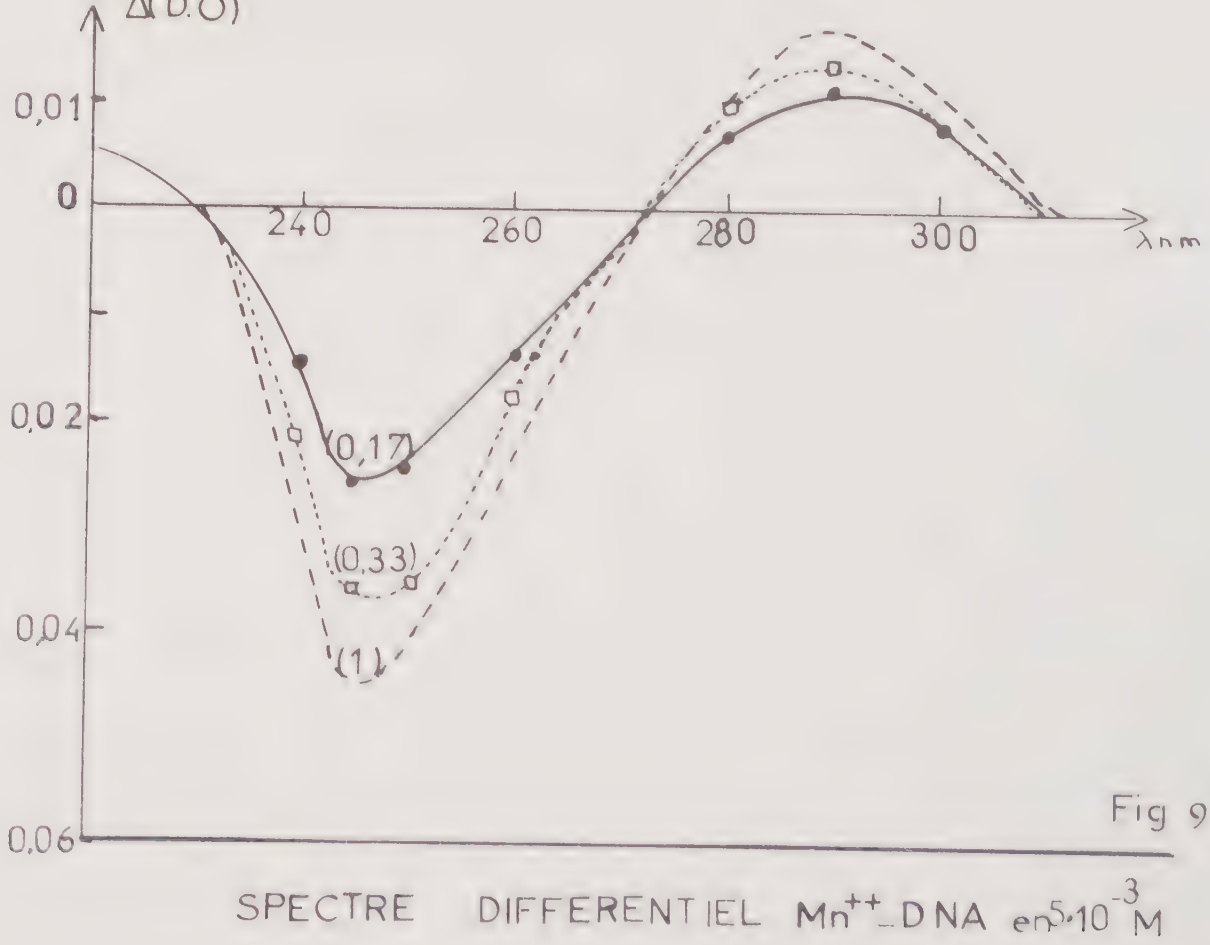


Fig. 9'. Les chiffres entre parenthèses indiquent les valeurs du rapport Mn^{++}/P DNA de D.O. à 3

former des agrégats résultant du pontage par Cu^{++} de deux groupes phosphates appartenant à des molécules distinctes. De tels agrégats peu nombreux pourraient se trouver éliminés lors de la centrifugation qui précède toutes les mesures de diffusion de la lumière.

A cette intensité absorbée parasite, correspond une densité optique qui représente environ 1% de la densité optique totale ce qui va se traduire par un déplacement d'ensemble du spectre différentiel. A l'aide des données spectroscopiques et de la formule (4) (voir Méthodes) nous pouvons calculer $(\varepsilon_L - \varepsilon_0)$. On trouve $\varepsilon_L - \varepsilon_0 = 1380$. Cette valeur de $\varepsilon_L - \varepsilon_0$ est utilisée pour déterminer en 5×10^{-3} M $NaClO_4$ la valeur de r et de Cu_0 pour chaque Δ(D.O) à 280 mμ. On peut tracer ainsi le diagramme de Scatchard de la figure 8. La quantité r/A_0 n'est plus une fonction linéaire de r. Les premiers points ne peuvent être utilisés car la quantité de Cu^{++} libre est trop faible pour être mesurée avec précision par différence entre deux valeurs pratiquement identiques. Ils doivent correspondre à une constante d'association au moins aussi élevée que celle trouvée en 0,1 M.

Par contre, les points expérimentaux de la figure 7 donnent une valeur de k beaucoup plus faible.

Il y a donc à cette force ionique, hétérogénéité des sites de fixation, le nombre total des sites étant beaucoup plus élevé qu'en 0,1 M.

On peut par ailleurs obtenir des spectres différentiels du même genre en travaillant avec d'autres métaux que le cuivre.

Nous avons représenté sur la figure 9 les spectres différentiels obtenus avec Ni^{++} et Fe^{++} dans les mêmes conditions. A quantités équivalentes d'ions Cu^{++}, Fe^{++}, Ni^{++}, on constate que si l'allure du spectre reste la même, la variation de densité optique dépend du cation utilisé.

A cette même force ionique on n'observe aucun effet avec Mn^{++}. Ce n'est qu'à force ionique beaucoup plus faible (5×10^{-3} M $NaClO_4$) qu'on peut observer avec le manganèse l'apparition d'un spectre différentiel correspondant à une fixation sur les bases (figure 9'). Notons enfin qu'une augmentation d'intensité du spectre différentiel comparable à celle causée par diminution de la force ionique peut être obtenue en

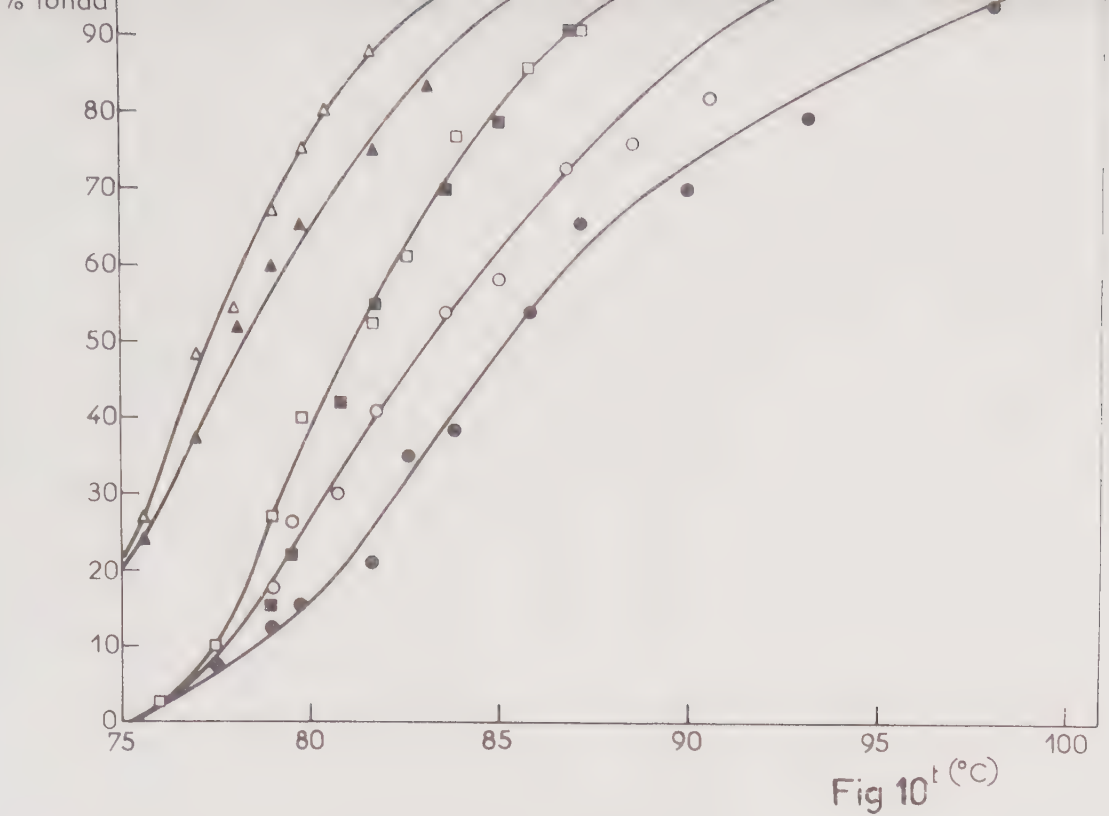


Fig. 10. Courbes de fusion des paires AT et GC en 0,1 M $NaClO_4$: (□) DNA seul, AT ; (○) DNA seul, GC ; (■) DNA avec 3 Cu^{2+}/100 P, AT ; (●) DNA avec 3 Cu^{2+}/100 P, GC ; (Δ) DNA avec 30 Cu^{2+}/100 P, AT ; (▲) DNA avec 30 Cu^{2+}/100 P, GC.

chauffant la solution à des températures inférieures à la température de fusion du DNA.

Courbes de Fusion

En 0,1 M ClO_4Na on réalise la fusion d'une solution de DNA selon la méthode décrite précédemment. On utilise des concentrations de DNA allant de 2,2 à 3.10^{-4} M en P et deux concentrations de Cu^{++} différentes : 3 Cu^{++}/100 P et 30 Cu^{++}/100 P. En utilisant la méthode décrite par Felsenfeld et Sandeen (1962) on obtient des faisceaux de droites. A chaque température correspond une droite dont la pente et l'ordonnée à l'origine nous donnent le pourcentage des paires AT et GC fondues à cette même température.

Nous avons représenté sur la figure 10 les courbes de fusion ainsi déterminées des paires AT et GC dans les cas suivants : DNA seul, DNA avec 3 Cu^{++}/100 P, et DNA avec 30 Cu^{++}/100 P. Dans le cas où la quantité totale de Cu^{++} est faible (3%) on observe une stabilisation des paires GC sans modification de la stabilité des paires AT. L'augmentation de la quantité de Cu^{++} totale (30%) se traduit par une destabilisation simultanée des paires AT et GC.

On retrouve là les résultats obtenus par Venner et Zimmer (1966) ou plus récemment par Eichhorn et Shin (1968) à force ionique plus faible, avec cependant une précision importante : la stabilisation observée en présence de faibles quantités de Cu^{++} est due à la seule stabilisation des paires GC.

L'absence de fusion du poly-dGdC en présence de Cu^{++} (0,4 Cu^{++}/P) nous confirme ce fait. Dans ces conditions et à faible force ionique (10^{-3} M ClO_4Na) le dGdC garde une même valeur de D.O quelle que soit la température (100°C).

Dans le cas du dAT par contre on retrouve les résultats de Hiai faisant état d'une augmentation de la T_m du dAT, à faible force ionique en présence de cuivre.

Fig. 12

Fig. 12. Courbe de fusion du complexe Cu^{++} - DNA en 5.10^{-3} M. ($Cu^{++}/P = 2$). La flèche verticale indique la température à laquelle est faite l'addition de sel nécessaire pour porter la solution en 0,2 M. Chauffage et refroidissement sont indiqués par les flèches horizontales.

Renaturation

Si l'on chauffe un DNA en présence de cuivre et en faible force ionique au-delà de sa température de fusion, il est possible ensuite de le renaturer. L'addition de sel en molarité suffisante (0,15 à 0,2 M ClNa par exemple) après refroidissement permet de récupérer un DNA présentant toutes les caractéristiques du DNA natif.

Deux conditions sont cependant nécessaires :

- la présence d'une quantité suffisante de cuivre,
- le chauffage de la solution à une température inférieure à 80°C environ.

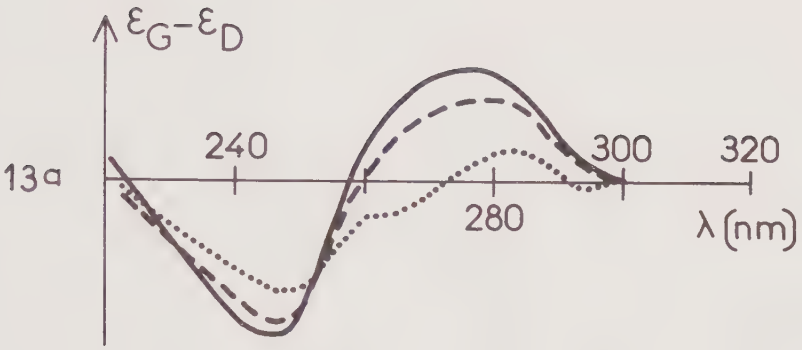
Richard et Pacault (1970) ont étudié la cinétique de renaturation du DNA en suivant au cours de celle-ci la libération des ions Cu^{++} à l'aide d'une électrode sélective. Ces auteurs constatent que la cinétique de renaturation suivie par mesure de la densité optique est superposable à la cinétique de relarguage des ions cuivriques.

Afin d'essayer de comprendre le phénomène, nous avons réalisé deux types d'expériences :

- nous avons essayé de renaturer un DNA fondu en présence de Cu^{++} et en 0,1 M. Quelle que soit la quantité de Cu^{++} ($2\ Cu^{++}/P$) présente dans le milieu, la renaturation n'a jamais été possible.

- Sur un DNA de thymus de veau fondu dans des conditions permettant sa renaturation ultérieure ($2\ Cu^{++}/P$ en 5.10^{-3} M ClO_4Na), nous avons ajouté à chaud la quantité de sel nécessaire pour porter la solution en 0,2 M. La figure 12 nous montre que dans ces conditions on obtient une hyperchromicité supplémentaire de quelques pour-cents, hyperchromicité que l'on peut attribuer à la fusion d'un certain nombre de paires de bases qui étaient encore appariées, et maintenaient entre eux les deux brins de DNA. En refroidissant cette solution, nous constatons qu'il n'y a plus de renaturation possible pour ce DNA.

Nous avons vérifié que l'hyperchromicité provoquée par l'addition de sel à chaud n'était pas due à la formation d'un complexe entre l'ion cuivrique et le sel, présentant une absorption à 260 nm.



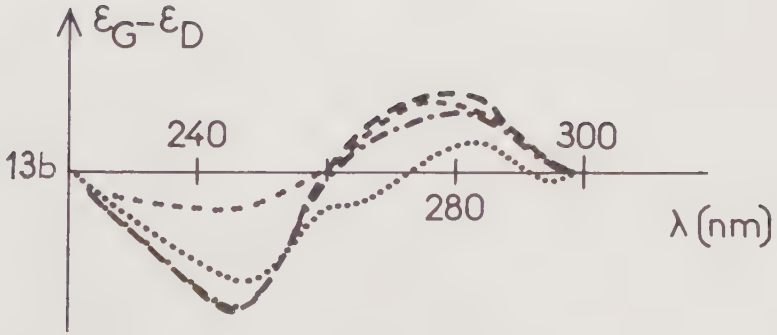


Fig. 13. Spectres de dichroïsme circulaire des complexes Cu^{++} - I

13a) ——— sans Cu^{++}

.... $Cu^{++}/P = 2$ en $5 . 10^{-3}$ M

---- $Cu^{++}/P = 2$ en 0,15 M.

13b) -.-.-après renaturation en 0,15 M

.. .. dénaturé à 70°C en 5.10^{-3} M.

Dichroïsme circulaire

La figure 13 nous montre les spectres de dichroïsme circulaire des complexes Cu^{++}-DNA.

- En 0,15 M et en présence de cuivre, la diminution de la bande positive du DNA est attribuée à la formation du complexe entre le cuivre et les guanines. Le nombre de guanines impliquées dans un tel complexe étant de l'ordre de 5% (pour un DNA de thymus de veau), la modification du signal de dichroïsme correspondant aux bases touchées est importante.

- A faible force ionique, le spectre de dichroïsme du complexe Cu^{++} - DNA est modifié qualitativement (apparition d'une bande négative à 265 nm), et quantitativement, indiquant une augmentation du nombre de sites de fixation, mais également l'existence de sites de fixation de type différent.

- Le DNA renaturé (après avoir été dénaturé en présence de Cu^{++} et en faible force ionique) par addition de sel (0,15 M) présente un spectre de dichroïsme circulaire voisin de celui du DNA ayant fixé Cu^{++} en 0,15 M. Les changements de conformation observés lors de la dénaturation sont donc bien réversibles. Ce résultat est en accord avec les données récentes de dispersion optique rotatoire (Zimmer, Luck, Fritzsche et Triebel, 1971).

Nous avons étudié la complexation du cuivre sur le DNA en 5.10^{-3} M ClO_4Na en suivant les modifications du spectre de dichroïsme circulaire à deux longueurs d'onde (270 et 245 nm), correspondant respectivement au maximum et au minimum de ce spectre (figure 14).
Si l'on désigne par a le rapport Cu^{++}total/nucléotide, on observe pour des valeurs de a comprises entre 0 et 0,2 une forte diminution du signal à 270 nm, la bande négative restant inchangée. Pour des valeurs de a comprises entre 0,2 et 0,5 les deux bandes diminuent, et cette diminution se poursuit jusqu'à des valeurs de a = 1 pour la bande à 245 nm.
Pour des valeurs de a supérieures à 1, on ne détecte plus aucun changement de dichroïsme circulaire.

A faible force ionique, la fixation du cuivre se fait donc en deux étapes correspondant à deux sites différents sur le DNA.

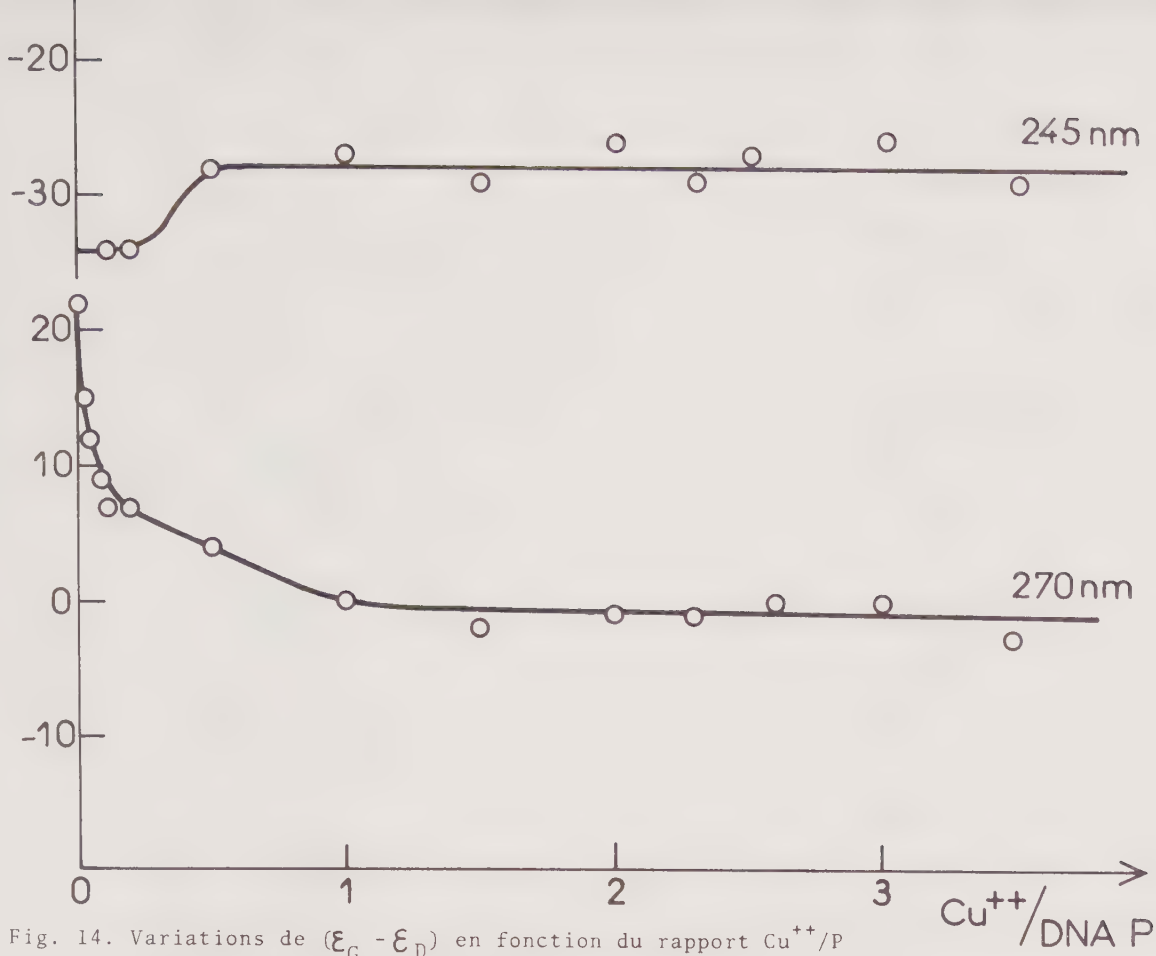
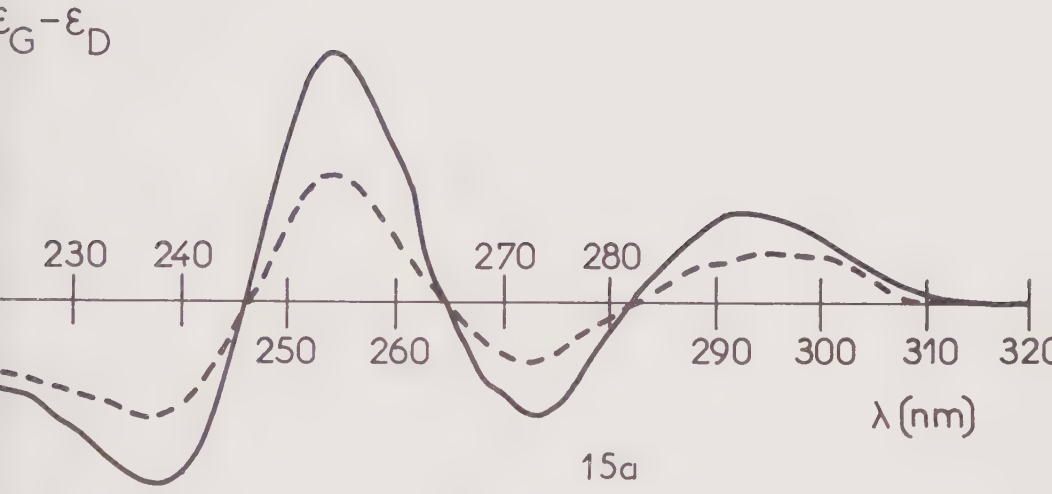


Fig. 14. Variations de $(\varepsilon_G - \varepsilon_D)$ en fonction du rapport Cu^{++}/P à deux longueurs d'onde différentes en 10^{-3} M $NaClO_4$.

Fig.15



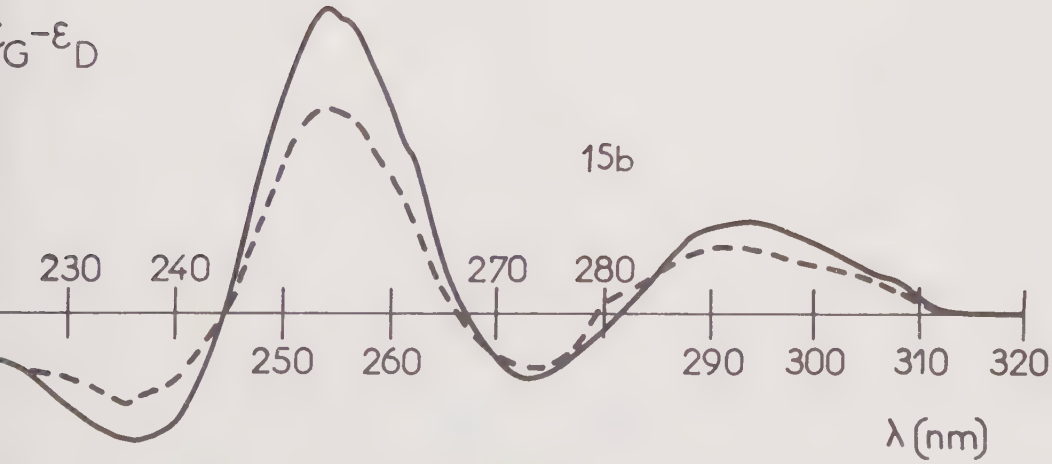


Fig. 15. Spectres de dichroïsme circulaire des complexes Cu^{++} - dGdC
15a) en 5.10^{-3} M $NaClO_4$
——— $Cu^{++}/P = 0$ ----- $Cu^{++}/P = 1$ ou 2
15b) en 0,2 M $NaClO_4$ ----- $Cu^{++}/P = 0,2$ à 1.

Fig. 16

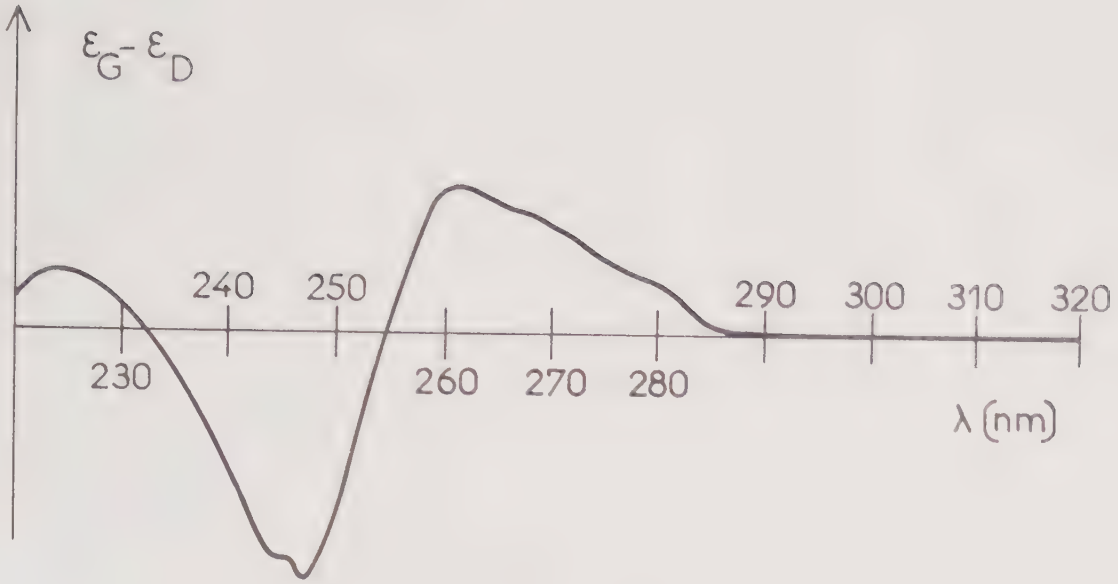


Fig. 16. Spectres de dichroïsme circulaire des complexes Cu^{++}-dAT. Les courbes obtenues pour différents rapports Cu^{++}/P sont superposables.

Ces expériences ont été complétées par l'étude du dichroïsme circulaire de deux polydésoxyribonucléotides, dAT et dGdC en présence de Cu^{++}.
On voit sur la figure 15 que dans le cas du dGdC, la nature des changements de dichroïsme circulaire est la même quelle que soit la force ionique. Le poly-dGdC ne présente donc vraisemblablement qu'un seul type de fixation pour Cu^{++} quelle que soit la force ionique.
La figure 16 montre que l'on ne peut détecter aucun changement de dichroïsme circulaire dans le spectre du poly-dAT mis en présence de cuivre.

Diffusion de la Lumière, Viscosité et Sédimentation

Les principaux résultats sont résumés dans le tableau V. Pour de petites quantités de cuivre (3 Cu^{++}/100 P), on n'observe aucune modification apparente du DNA.

TABLEAU V

Cu^{++}/100 P	M/L	R, Å	(η)	S
0	280	3100	84,5	19,6
3	280	3100	-	19,4
10	300	3040	82	20,1
30	320	2965	80	21,4
100	340	2960	78	-

Pour les valeurs plus élevées on retrouve le phénomène général de repliement de la chaîne qui s'accompagne de la diminution de R et de (η) et de l'augmentation de M/L et de S. Il n'est pas possible de relier entre elles les variations de ces différents paramètres. En particulier (η) diminue beaucoup moins que ne pourraient le laisser prévoir les variations de S ou de R,

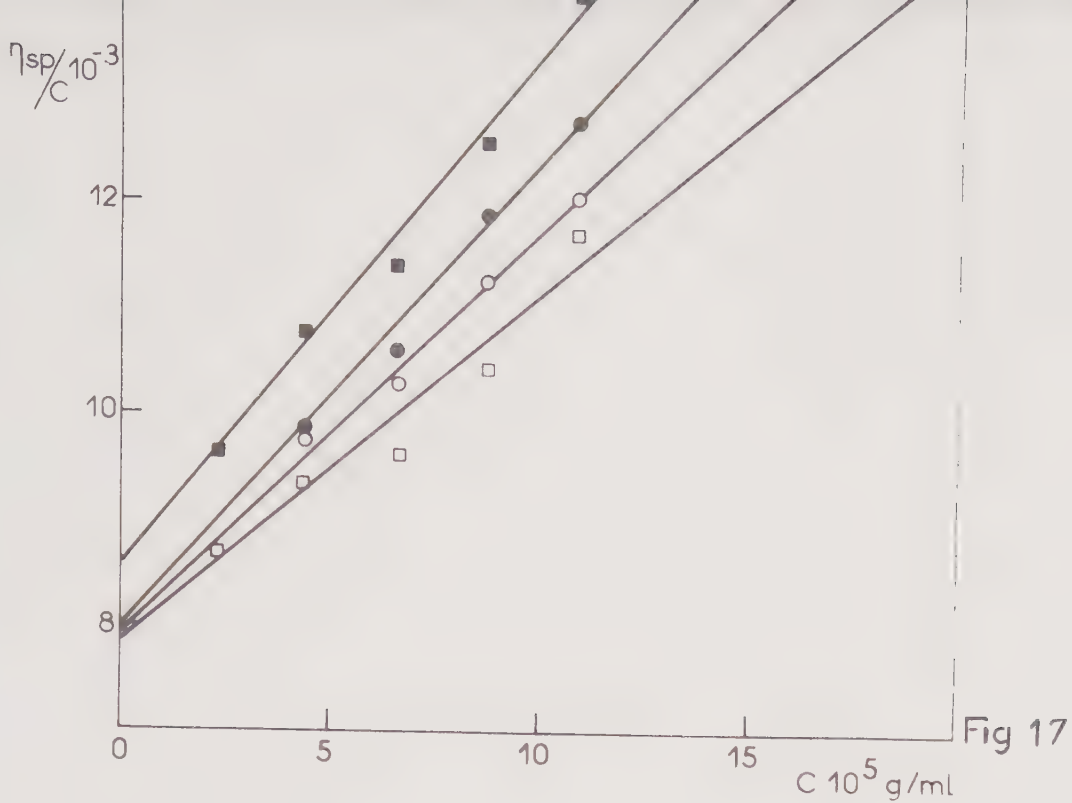


Fig 17

Fig. 17. Variation de η_{sp}/c (unités en cgs) en fonction de c ; (■) DNA seul ; (●) DNA + 10 Cu^{2+}/100 P ; (○) DNA + 30 Cu^{2+}/100 P ; (□) DNA + 100 Cu^{2+}/100 P.

alors que M/L augmente considérablement. Un tel comportement correspond à des changements locaux de flexibilité qui affectent peu la configuration générale de la chaîne semi-rigide du DNA (figure 17).

Lorsque dans les mesures de diffusion, on garde le rapport $y = (Cu)/P$ constant pour les différentes dilutions, la valeur de r varie comme l'indique la relation (3).

On ne peut donc en principe comparer entre elles les valeurs de C/I obtenues pour chaque concentration puisque le DNA n'est pas dans la même configuration. La déformation du Zimm-plot peut être considérable et amener à des interprétations erronées (Hiai, 1965). Dans nos conditions de travail ($0<r<0,05$) le phénomène est très faible et nous pouvons le négliger.

3) Discussion

L'ensemble de nos résultats nous permet de proposer un modèle de fixation du cuivre sur les polynucléotides en général et le DNA en particulier. En présentant les différents types de sites de fixation nous indiquerons dans la mesure du possible pour chaque type de complexe :

- les différents facteurs susceptibles de modifier sa constante d'association k,
- sa stoechiométrie,
- les modifications des propriétés optiques du polymère dues à la fixation de Cu^{++} (absorption U.V, dichroïsme),
- son influence sur la stabilité du DNA (augmentation ou diminution de la T_m) ainsi que sur sa renaturation,
- les modifications enfin des propriétés morphologiques du polymère.

Fixation de Cu^{++} sur les polydésoxyribonucléotides en double hélice

Le DNA

a) Site I : les phosphates

Comme tout cation, Cu^{++} peut jouer le rôle d'un ion compensateur et être lié électrostatiquement aux groupements phosphates du DNA.

- Cette première catégorie de complexes se forme d'autant mieux que la force ionique du milieu est faible. En augmentant celle-ci, la compétition entre l'ion cuivrique (3.10^{-4} M) et l'ion Na^{+} (0,1 M dans notre cas) devient favorable à ce dernier. L'étude menée par Ropars (1965) en RPE, lui permet de distinguer les ions Cu^{++} liés aux phosphates des ions Cu^{++} liés aux bases du DNA et par là même de constater qu'en 0,1 M la fixation de Cu^{++} sur les phosphates est négligeable.

- En l'absence de tout autre site et pour des raisons d'électroneutralité la stoechiométrie de ce complexe serait de 0,5 Cu^{++}/P. C'est la stoechiométrie que l'on trouve pour un ion comme le magnésium Mg^{++} pour lequel les phosphates du DNA constituent le seul site de fixation possible (Clément, 1971)

- A une fixation de ce type correspond une stabilisation

Fig. 18 . Schéma du site possible de chélation de Cu^{2+} entre deux guanines superposées.

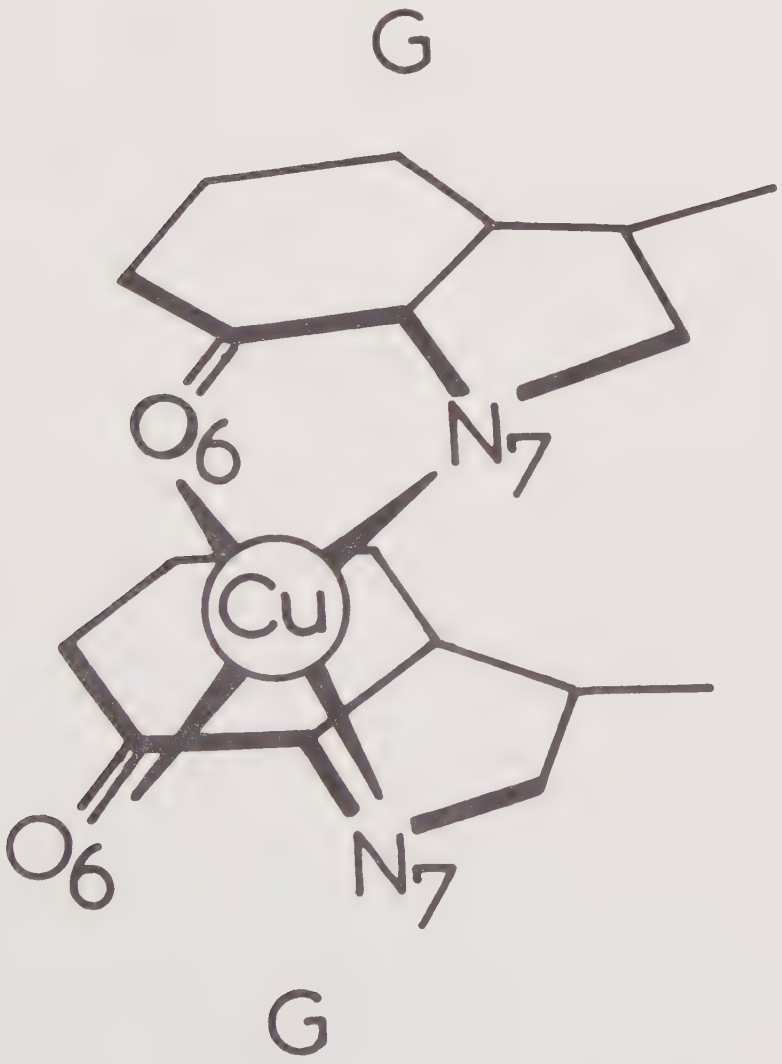


Fig 18

de la double hélice de DNA due à la diminution des forces de répulsion entre groupements phosphates chargés négativement. Cette stabilisation est observée pour Mg^{++} par exemple.

- L'influence d'un tel complexe sur les propriétés optiques du DNA est nulle.

- Son influence sur les propriétés morphologiques du polymère est nulle ou très faible, analogue à celle que l'on observe lorsque l'on fait varier la force ionique du milieu dans lequel est dissout le DNA.

b) Site II : les sites $\frac{GC}{GC}$

Le deuxième type de site de fixation du cuivre sur le DNA est constitué de deux guanines superposées sur un même brin. Les guanines étant de bons donneurs d'électrons et l'ion cuivrique un accepteur, ce complexe peut être du type à transfert de charge. La figure 18 schématise l'allure possible d'un tel complexe.

- La constante de fixation de ce complexe en 0,1 ou 0,2 M ClO_4Na est celle que l'on mesure par polarographie ($k = 2{,}3.10^5$ l/m). A une diminution de la force ionique correspond une augmentation de cette constante : c'est ce que nous montre le diagramme de Scatchard de la figure 8. Cette augmentation de la valeur de k est due au fait qu'en diminuant la force ionique, on augmente considérablement la concentration en ions Cu^{++} au voisinage du polyélectrolyte, modifiant ainsi les conditions locales de l'équilibre entre l'ion et le polymère.

- La stoechiométrie de ce complexe sera imposée par le nombre de sites $\frac{GC}{GC}$ dans le DNA étudié. Si nous comparons les valeurs trouvées par polarographie au nombre de ces sites existants sur des DNA de compositions en bases différentes, à l'aide des données de Josse, Kaiser et Kornberg (1961), nous constatons que les valeurs de n mesurées en 0,1 M ClO_4Na sont toujours supérieures aux valeurs théoriques. A force ionique plus élevée, les valeurs théoriques et expérimentales sont déjà sensiblement plus proches. Plusieurs causes peuvent être responsables de cette différence : i) la formation d'une faible quantité de complexes du type III, favorisée par le fait que les derniers points de l'isotherme de Scatchard sont obtenus à des rapports $Cu^{++}/P \simeq 2$.

ii) l'existence sur le DNA d'un certain nombre de bases non engagées dans des liaisons hydrogène (et donc susceptibles de fixer Cu^{++}), par suite de défauts introduits lors de la préparation du DNA.

- Ce complexe est responsable de la modification des propriétés optiques du DNA. Le spectre différentiel observé est le même que celui qui serait produit par la protonation de certaines cytosines dans le DNA, protonation causée par la redistribution de l'ensemble des charges sur la paire GC après la fixation de l'ion Cu^{++} sur la guanine (figure 9).
Le spectre de dichroïsme circulaire est modifié (figure 13).

- L'intercalation de Cu^{++} entre deux paires GC provoque une stabilisation de celle-ci. L'analyse des courbes de fusion par la méthode de Felsenfeld nous montre en effet que la stabilisation observée pour les premiers sites de fixation touche bien les seules paires GC et fort probablement un nombre très limité de celles-ci, puisque en présence de quantités supérieures de cuivre on observe une destabilisation de l'ensemble du DNA, destabilisation attribuée, comme nous le verrons plus loin, à la formation du complexe du type III.
C'est à l'existence de ces sites que peut être attribuée la renaturation du DNA observée lors des expériences conduites à faible force ionique. Dans ces conditions en effet, les sites $\frac{GC}{GC}$ sont suffisamment stabilisés pour que guanine et cytosine restent appariées à une température supérieure à la T_m, permettant ainsi la renaturation d'un DNA qui en fait n'a pas été entièrement fondu. En passant en force ionique élevée, à haute température (figure 12) on dissocie ce complexe, provoquant ainsi la fusion des paires $\frac{GC}{GC}$ et l'apparition d'un hyperchromisme supplémentaire. Un refroidissement ultérieur de la solution ne permet plus alors de renaturer le DNA. Cette fusion de la totalité des paires GC est du reste celle que l'on observe en réalisant la fusion du DNA en 0,1 M ClO_4Na, conditions dans lesquelles la stabilisation des paires GC observée dans l'analyse de Felsenfeld n'évite pas leur fusion. La renaturation d'un DNA fondu en 0,1 M ClO_4Na n'a jamais été possible.

- Enfin, la formation de ce complexe (en un nombre limité de sites) n'a que peu ou pas d'influence sur la morphologie générale

du DNA en solution, comme nous le montrent nos mesures de diffusion de la lumière, de viscosité et de sédimentation, pour de faibles valeurs du rapport Cu^{++}/P.

c) Site III : Chelates entre guanine et phosphate

Un troisième type de complexe enfin peut être formé par chélation entre l'azote 7 de la guanine et le phosphate voisin.

- En raison de la compétition entre les contre-ions positifs situés au voisinage des groupes phosphates et l'ion Cu^{++}, la constante d'association de ce type de site va être très sensible à la force ionique. L'augmentation de celle-ci rend très difficile la formation de tels complexes. Néanmoins, en 0,1 M ClO_4Na et en présence d'une concentration suffisante d'ions cuivriques, il semble bien qu'un certain nombre de ces sites puisse être occupé. En effet, le passage à une force ionique supérieure (0,2 ou 0,3 M) diminue la valeur de n.

- En faible force ionique, la constante d'association de ce type de site sera très probablement supérieure à celle des sites du type II.

- Les guanines étant impliquées dans la formation de ce complexe, nous observerons une modification du spectre U.V. du DNA ainsi que de son spectre de dichroïsme circulaire. Ce dernier présente un changement d'allure caractéristique, lorsque l'on passe d'une force ionique élevée (0,15 M) à une force ionique plus faible (figure 13). La modification qualitative du spectre (bande négative à 265 nm) permet de supposer l'existence à faible force ionique d'un type de site différent (type III) de celui observé à force ionique élevée (type II).

- La formation d'un tel complexe va considérablement destabiliser la double hélice en provoquant un affaiblissement important des forces des liaisons hydrogène entre guanines et cytosines (sans doute par flexion de la liaison). Dans des conditions favorables à sa formation (faible force ionique et rapport Cu^{++}/P élevé), on observera une fusion quasi totale de l'ensemble des paires GC. La T_m mesurée dans ces conditions sera celle d'un DNA ne comportant que des paires AT, c'est-à-dire la T_m d'un dAT mesurée dans les mêmes conditions de force

ionique et de concentration en Cu^{++} (Hiai, 1965 ; Venner et Zimmer, 1966).

- Cette destabilisation des paires GC va s'accompagner d'une diminution considérable de la rigidité locale du DNA. C'est ce que nous montrent nos mesures de diffusion de la lumière, viscosité et sédimentation en 0,1 M, lorsque l'on augmente le rapport Cu^{++}/P. En faible force ionique ce phénomène est encore beaucoup plus net (Hiai, 1965).

Le dAT

Il n'est susceptible de fournir à l'ion Cu^{++} que des sites du type I. On n'observe donc aucune des propriétés attribuées aux sites des types II et III (spectre U.V, dichroïsme, destabilisation), mais seulement comme l'ont montré Hiai, Venner et Zimmer, une légère augmentation de la T_m due probablement à un simple effet électrostatique sur les phosphates ainsi que nous l'avons signalé en parlant des sites du type I.

Le dGdC

Il est théoriquement susceptible de présenter les trois types de sites de fixation. Pratiquement la fixation de Cu^{++} en des sites du type II, ne laisse aucune guanine disponible pour la formation d'un chelate entre base et phosphate.
Le fait de n'observer que le complexe du type II explique :

- que les spectres de dichroïsme circulaire soient semblables quelle que soit la force ionique (figure 15),
- que du dGdC ayant fixé Cu^{++} sur l'ensemble des sites disponibles (0,25 Cu^{++}/P) ne fonde plus.

Fixation de Cu^{++} sur les polynucléotides en simple brin

Elle n'a pas, dans notre travail, fait l'objet d'autant d'attention que la fixation de Cu^{++} sur le DNA : la stoechiométrie en particulier n'avait été faite que pour permettre de mieux comprendre celle du DNA. Néanmoins le modèle à trois sites de fixation que nous venons d'exposer peut vraisemblablement convenir aux polynucléotides simple brin.

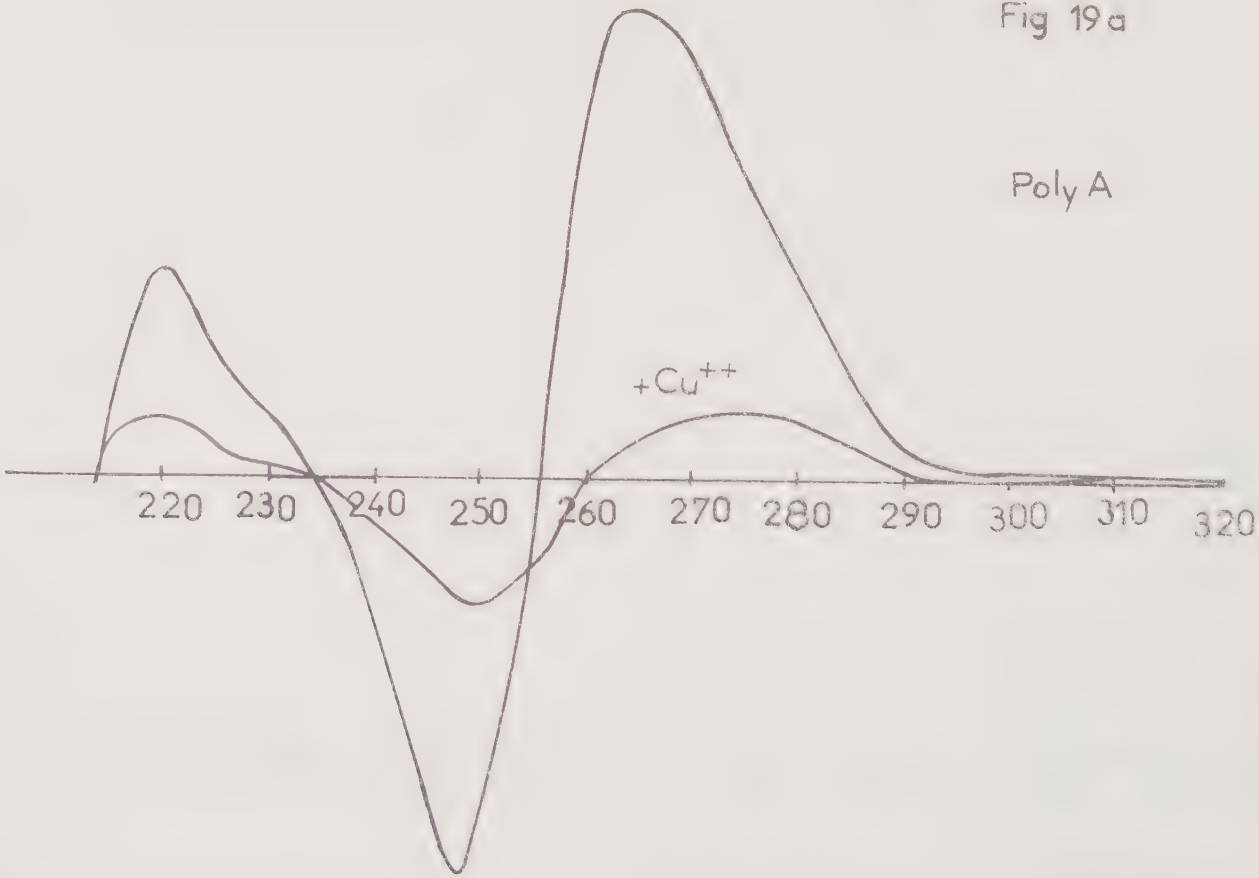
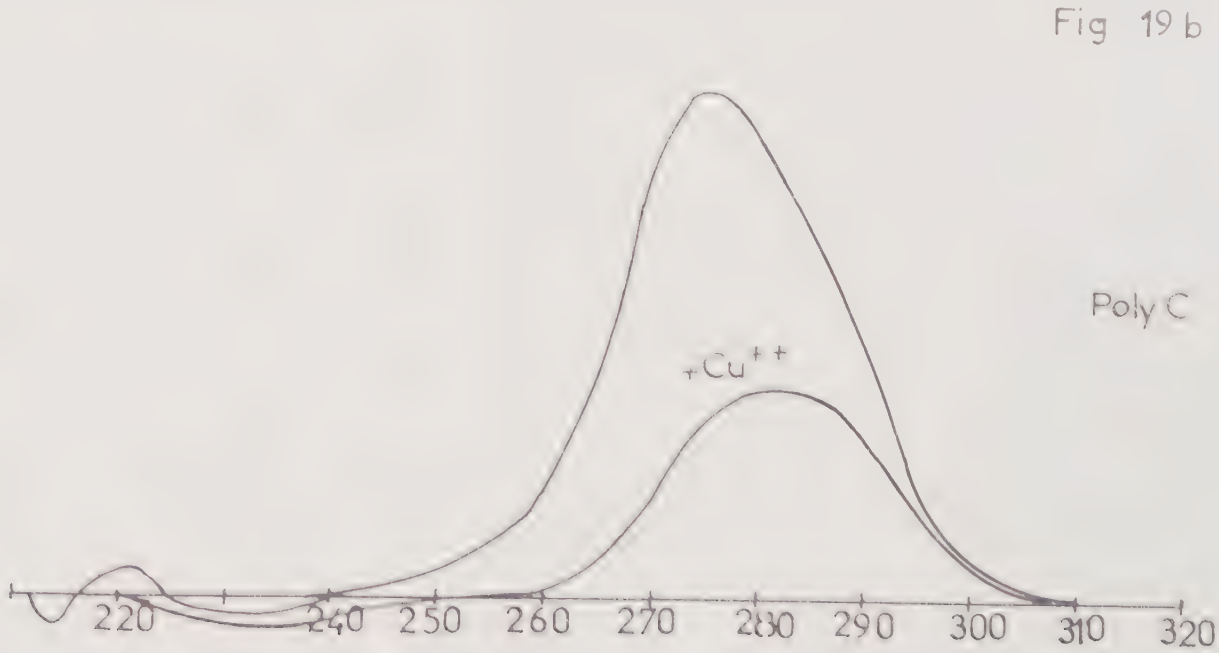


Fig. 19a. Spectres de dichroïsme circulaire du poly-rA en présence de Cu^{++}.

Fig. 19b. Spectres de dichroïsme circulaire du poly-rC en présence de Cu^{++}



a) Site I : les phosphates

Ce qui a été dit précédemment peut être répété ici. C'est apparemment le seul site de fixation possible sur le poly-rU, à condition bien entendu de se placer en faible force ionique.

b) Site II : chelation entre deux bases

A force ionique élevée (0,1 M), il s'agit là du seul site de fixation possible pour Cu^{++}, tant sur le poly-rA que sur le poly-rC neutre. Il rend compte de la stoechiométrie mesurée (n = 0,5). Sa constante d'association est relativement forte ($k \simeq 10^6$ 1/mole).
Cette fixation s'accompagne comme nous l'avons vu d'un léger hyperchromisme (figure 4). Elle s'accompagne également d'une modification du signal de dichroïsme circulaire du poly-rA et du poly-rC (figure 19).
L'insertion de l'adenine ou de la cytosine dans une structure en double brin (poly-rC ou poly-rA acide, DNA) rend impossible la formation de ce complexe, les sites de chelation sur la base étant alors, soit impliqués dans les liaisons hydrogène entre bases complémentaires (N_1 de la cytosine dans le poly-rC acide et dans le DNA, N_1 de l'adenine dans le DNA), soit protonés (N_1 de l'adenine dans le poly-rA acide)

c) Site III : chelation entre base et phosphate

Ce qui a été dit de la constante d'association de ce type de site dans le cas du DNA peut être répété ici. En 0,1 M ClO_4Na l'existence de tels chelates entre adenine et phosphate ou cytosine et phosphate n'est sans doute pas possible.

- Le modèle de fixation de Cu^{++} sur les polynucléotides rend compte de l'ensemble de nos résultats expérimentaux, ainsi que de ceux qui avaient été exposés dans l'introduction de ce chapitre.
- Ils permettent également de comprendre un certain nombre de faits expérimentaux récemment publiés.

i) La modification du spectre infra-rouge des guanines et des cytosines dans un DNA ayant fixé Cu^{++} (Zimmer et coll., 1971) est consécutive à la formation d'un complexe du type III au niveau des guanines. Il y a alors rupture de liaison hydrogène entre

guanine et cytosine, ce qui peut rendre possible la formation d'un chelate du cuivre entre cytosine et phosphate.

ii) Notre modèle permet également de comprendre pourquoi il est nécessaire de travailler à des rapports Cu^{++}/P élevés pour renaturer un DNA fondu en faible force ionique (Richard, 1970). En séparant les deux brins de la double hélice, on fournit à l'ion cuivrique des sites d'affinité supérieure aux sites $\frac{GC}{GC}$: en faible force ionique des sites de type II ou III et en force ionique élevée des sites du type II uniquement. Il y a alors en l'absence d'un gros excès de Cu^{++} capable de saturer les différents sites, un déplacement de Cu^{++} des sites $\frac{GC}{GC}$ permettant ainsi la fusion totale du DNA, que l'on ne pourra plus ensuite renaturer.

iii) Le modèle enfin rend compte de la cinétique de renaturation mesurée pour un DNA fondu en faible force ionique (Richard, 1970). Cette cinétique est d'autant plus lente que le DNA fondu est riche en GC, ce qui semble bien montrer la grande stabilité du chelate du type III entre guanine et phosphate.

- Nous soulignerons enfin, dans le modèle exposé pour rendre compte de nos résultats expérimentaux, un fait essentiel : LA FIXATION DE Cu^{++} SUR UN DNA NATIF AU NIVEAU DES SEULES GUANINES.

C) CONCLUSION GENERALE

Le modèle proposé pour la fixation de l'ion cuivrique sur le DNA rend compte de l'ensemble des résultats expérimentaux, même s'il ne nous fournit pas la conformation exacte du complexe entre Cu^{++} et les guanines, que nos méthodes d'étude ne nous permettent pas d'aborder. Il confirme le fait que sur le DNA, comme sur le nucléoside isolé, c'est bien la guanine dont la réactivité vis à vis de l'ion Cu^{++} est la plus grande (Fiskin et Beer, 1965 ; Eichhorn, Clark et Decker, 1966 ; Zimmer et Venner, 1967 ; Fritsche et Zimmer, 1968).

La comparaison des propriétés des complexes DNA-Cu^{++} avec celle des complexes DNA-M^{++} étudiés par ailleurs nous permet de constater les points suivants :

- la liaison d'un certain nombre de cations divalents au DNA diminue la stabilité de la double hélice (Eichhorn, Shin,1968). L'effet est net dans le cas de Fe^{++}, Cd^{++}, Zn^{++}, Ni^{++} et Mn^{++}. Cette destabilisation doit pouvoir s'expliquer comme pour Cu^{++} par la formation d'un chelate entre guanine et phosphate. On observe pour ces différents ions des modifications du spectre U.V du DNA analogues à celles observées avec Cu^{++}.

- Parmi les cations cités plus haut, Zn^{++} et Cd^{++} sont capables d'assurer la renaturation complète d'un DNA fondu en leur présence et en faible force ionique (Eichhorn et coll., 1968). Nous pensons que cette propriété est liée : i) à la faculté de ces ions de former un complexe du type II capable lors de la fusion, de maintenir ensemble les deux brins en certains points de la double hélice. ii) à la destabilisation causée par le chelate formé par Cu^{++} entre le N_7 de la guanine et le phosphate : cette destabilisation permet la fusion de la quasi totalité des paires de bases, à une température inférieure à la température de fusion des sites engagés dans des complexes du type II.

Ainsi, possibilité de renaturation d'une part, destabilisation d'autre part, semblent être deux phénomènes liés, la renaturation étant possible uniquement avec les ions susceptibles de destabiliser suffisament le DNA.

L'action mutagène de l'ion cuivrique enfin doit être localisée au niveau de ses sites de fixation sur le DNA : les guanines. Il ne nous est malheureusement pas possible de préciser en quoi cette fixation perturbe le fonctionnement de l'enzyme de replication : il nous faudrait pour cela connaitre les modifications introduites dans la séquence du DNA d'un mutant induit par Cu^{++} par rapport à la séquence originale du DNA de la souche sauvage.
Ces données étaient disponibles dans le cas d'un mutagène comme la proflavine : nous avons donc essayé de voir à quel niveau se situait l'action mutagène d'un tel colorant.

CHAPITRE II

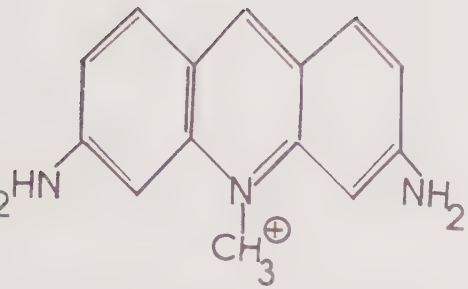
INTERACTIONS ENTRE DESOXYRIBONUCLEOTIDES ET COLORANTS D'ACRIDINE

A) INTRODUCTION

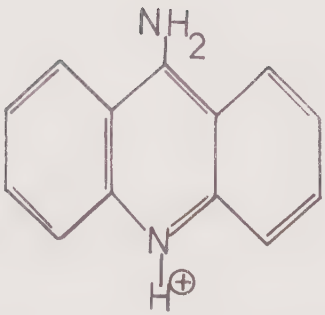
Si l'on connait depuis longtemps le rôle des acridines comme agents antibactériens (proflavine par exemple), et celui des phénanthridines (bromure d'éthidium) comme trypanocides, c'est la recherche de l'origine du pouvoir mutagène de ces substances qui a fait ces dernières années l'objet d'un grand nombre de travaux (Blake et Peacocke, 1968; Waring, 1968 ; Peacocke, 1970). Les mutants induits par les colorants d'acridine avaient auparavant fourni la première preuve de la nature "triplet" du code génétique (Crick, Barnett, Brenner et Watts-Tobin, 1961 ; Barnett, Brenner, Crick, Shulman et Watts-Tobin, 1967) : ils ont récemment permis de déterminer les codons utilisés in vivo (Berger, Brammar, Yanofsky, 1968).

Les méthodes physicochimiques classiques d'étude des macromolécules en solution montrant une augmentation de la viscosité du complexe DNA-colorant et l'augmentation de sa constante de sédimentation, associées à l'étude de la diffraction des rayons X, ont permis à différents auteurs d'établir que les molécules de colorant s'intercalaient entre deux paires de bases adjacentes du DNA (Luzzatti, Masson, Lerman, 1961 ; Mauss, Chambron,Daune, Benoit, 1967 ; Bauer et Vinograd, 1968, 1970 ; Cohen, Eisenberg, 1969 ; Waring, 1970).

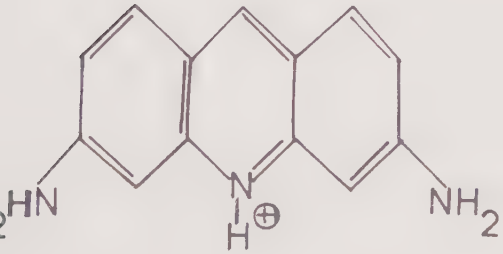
Lerman (1961), Fuller et Waring (1964), Paoletti et Le Pecq (1971) précisent l'effet exact de l'intercalation sur la géométrie de l'hélice : la distance entre deux plateaux de bases adjacents passe de 3,4 à 6,8 Å lors de l'intercalation de la proflavine. Il apparait par contre difficile de préciser si le recouvrement du colorant par les plateaux de bases est total ou partiel (Lerman, 1963, 1964 ; Pritchard, Blake et Peacocke, 1966).



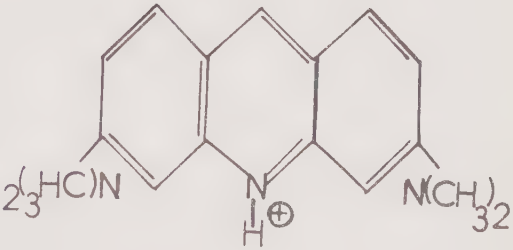
Acriflavine



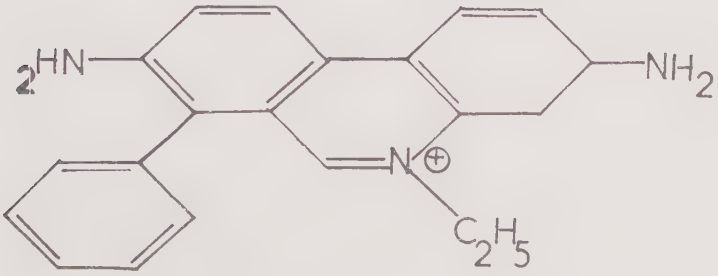
9 Aminoacridine



Proflavine



Acridine orange



Ethidium

La fixation de ces colorants sur le DNA provoque lors de sa replication l'addition ou la délétion d'une ou plusieurs bases. A partir des propriétés d'intercalation de ces substances, différents schémas ont été proposés pour expliquer les mutations observées.

- Celui de Brenner, Barnett, Crick et Orgel (1961), suppose l'insertion du mutagène sur un seul des deux brins du DNA, l'addition ou la délétion d'une base survenant alors lors de la replication.

- Celui de Lerman (1963) attribue addition ou délétion à la recombinaison entre deux molécules de DNA homologues, dont l'une a fixé le mutagène.

- Le troisième modèle est celui de la "frameshift mutation", ou mutation par déplacement du cadre de lecture (Streisinger, Okada, Emrich, Newton, Tsugita, Terzaghi et Inouye (1966). Ces auteurs proposent en particulier d'attribuer le pouvoir mutagène des acridines à leur faculté de stabiliser la double hélice de DNA (Lerman, 1964), augmentant de ce fait la durée de vie des liaisons hydrogène entre bases appariées et donc la probabilité d'une synthèse supplémentaire avant la fusion de ces régions.

Aucun de ces modèles n'est totalement satisfaisant : celui de Brenner et Coll. implique la replication du DNA, replication qui dans le cas du bromure d'éthidium par exemple, ne semble pas nécessaire pour provoquer l'apparition de colonies "petites" chez la levure (Fukuhara et Kujawa, 1970).
Un certain nombre d'expériences semblent contredire le modèle de Lerman, liant la mutation à la recombinaison de DNA homologue, du moins chez les bactéries (Maillet, 1970).
Enfin la stabilisation du DNA par les colorants d'acridine est un phénomène très général et a lieu avec des colorants mutagènes comme la proflavine, mais aussi des produits non mutagènes comme l'acridine orange (nous excluons ici l'action mutagène de l'acridine orange par effet photodynamique).

En sus des travaux démontrant l'insertion du colorant et sur lesquels s'appuient directement les différents modèles proposés pour expliquer la mutagénèse par les colorants d'acridine, plusieurs auteurs ont étudié les propriétés de fluorescence des complexes colorants-DNA. Ils concluent à l'existence de deux

types de sites sur la macromolécule (Tubbs, Ditmars, Van Winckle, 1964 ; Weill, Calvin, 1963 ; Thomès, Weill, Daune, 1969 ; Bidet, Chambron, Weill, 1971).

Pour la proflavine par exemple, les deux types de sites mis en évidence sont :

- des sites "allumés", sites dans lesquels le rendement quantique de fluorescence du colorant lié est celui du colorant libre : ce sont les régions AT du DNA.
- Des sites "éteints" , sites dans lesquels le rendement quantique de fluorescence du colorant lié est considérablement diminué : ce sont les régions GC du DNA.

La nature du complexe formé entre la proflavine et les paires GC et responsable de l'extinction de fluorescence reste pour le moment sujette à hypothèses, la plus couramment admise étant l'existence d'un complexe à transfert de charge entre la guanine (donneur d'électrons) et la proflavine (accepteur) (Tubbs et col., 1964 ; Thomès et col., 1971).

La fixation de l'acridine orange sur un DNA ne se traduit par contre par aucune inhibition de fluorescence, et les mesures de rendement quantique de fluorescence et de durée de vie de Weill (1963) lui permettent de conclure à l'existence d'un seul type de site pour ce colorant : des sites "allumés".

L'étude de l'activité mutagène de différents colorants montre par ailleurs de grandes différences d'une acridine à l'autre (Orgel, Brenner, 1961 ; Webb, Kubitscheck, 1963). L'acridine orange en particulier n'est pas mutagène à l'obscurité ; elle ne provoque pas la mutation "petite" de la levure (Marcovich, 1953) comme la proflavine ou le bromure d'éthidium.

Quelle est la nature du complexe responsable de l'inhibition de fluorescence observée pour certains colorants ?

Y-a-t'il une relation entre la formation de ce type de complexe et le pouvoir mutagène du produit considéré ?

C'est dans le but d'essayer de fournir une réponse à ces questions, que nous avons entrepris d'étudier les propriétés de fluorescence de différents colorants avec des polydésoxyribonucléotides de synthèse susceptibles de ne fournir au colorant qu'un seul type de site, à savoir le poly-dAT et le poly-dGdC.

Nous avons utilisé quatre acridines :

- proflavine, acriflavine, 9-aminoacridine et acridine orange,

et une phénanthridine : le bromure d'éthidium.

B) LES COMPLEXES COLORANTS-POLYDESOXYRIBONUCLEOTIDES

a) Matériel et méthodes

1) Matériel

Le poly-dAT et le poly-dGdC sont des produits Miles utilisés sans autre purification. Le poly-dGdC contient 48% de cytosine et 52% de guanine.

Nous indiquons pour chaque colorant sa provenance et l'abréviation utilisée dans la suite de ce travail.
La proflavine (Pro) est un produit B.D.H., l'acriflavine (Acri) un produit des Laboratoires K and K; la 9-aminoacridine (9 A) est un produit Aldrich Chemical Co et l'acridine orange (AO) un produit Merck.
Le bromure d'éthidium nous a été fourni par le Dr Le Pecq.
L'iodure de potassium (KI) est un produit Merck et le perchlorate de sodium ($NaClO_4$) un produit Fluka.

2) Méthodes

L'étude des complexes colorants-polydésoxyribonucléotides a été effectuée en faible force ionique (10^{-2} M $NaClO_4$) et à des valeurs du rapport phosphate/colorant (P/D) élevées et toujours égales ou supérieures à 10. Dans ces conditions la quantité de colorant libre est toujours négligeable (<1%) (Thomès et col., 1969), et l'on évite tout transfert d'énergie entre deux molécules de colorant (Weill et col., 1963 ; Armstrong, Kurucsev, Strauss, 1970).

- Absorption

Les spectres d'absorption ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Cary 15 et selon les cas sous des épaisseurs allant de quelques millimètres à un centimètre.

- Emission de fluorescence

Les spectres d'émission de fluorescence ont été obtenus à l'aide d'un appareil construit dans le laboratoire de Monsieur le Professeur Laustriat par le Dr H. Lami. Cet appareil utilise à l'excitation une lampe à vapeur de mercure de 200 Watt (SP 200 Philips) et un double monochromateur Zeiss MM-12. Pour l'observation

un photomultiplicateur EMI 6256S fait suite à un monochromateur à réseau Jarell-Ash. L'intensité de la lampe est contrôlée à l'aide d'un deuxième photomultiplicateur recevant une fraction du faisceau d'excitation, lequel pénètre dans la cuve en quartz sous une incidence normale. Les rendements quantiques des complexes colorants-polymères ont été mesurés par comparaison à ceux des colorants purs en solution. La longueur d'onde d'excitation choisie dans chaque cas a été celle du point isobestique des spectres d'absorption du colorant et du complexe colorant-DNA. Lorsque cela a été nécessaire, ces spectres ont été corrigés de façon à tenir compte de la variation en fonction de la longueur d'onde, de la transmission du monochromateur et de la réponse du photomultiplicateur. Les intensités $I(\lambda)$ ainsi obtenues sont alors multipliées par le facteur λ^2 de manière à obtenir une résolution constante en nombre d'onde $\bar{\nu}$, puis reportées en fonction de ce dernier. Les surfaces délimitées par ces courbes sont proportionnelles aux intensités totales de fluorescence et leurs rapports sont les mêmes que ceux des rendements quantiques.
Pratiquement les rapports des rendements colorant-DNA/colorant obtenus à partir des spectres ainsi corrigés ou à partir des spectres enregistrés directement sont identiques aux erreurs de mesure près. Le décalage entre les spectres d'émission du colorant et du complexe colorant-polymère est en effet peu important et l'erreur commise en calculant le rapport des rendements à partir du rapport des surfaces obtenues directement est faible.

- Polarisation de fluorescence

Si l'on excite une solution fluorescente par une lumière polarisée, l'émission de fluorescence est partiellement polarisée. On définit le taux de polarisation p par la relation :

$$p = \frac{I_{/\!/} - I_{\perp}}{I_{/\!/} + I_{\perp}}$$

où $I_{/\!/}$ et $I_{\perp}$ sont les composantes de la lumière de fluorescence respectivement parallèle et perpendiculaire à la direction de polarisation de la lumière excitatrice.

Les taux de polarisation sont déterminés à l'aide d'un polarimètre analogue à celui décrit par Weber (1956).

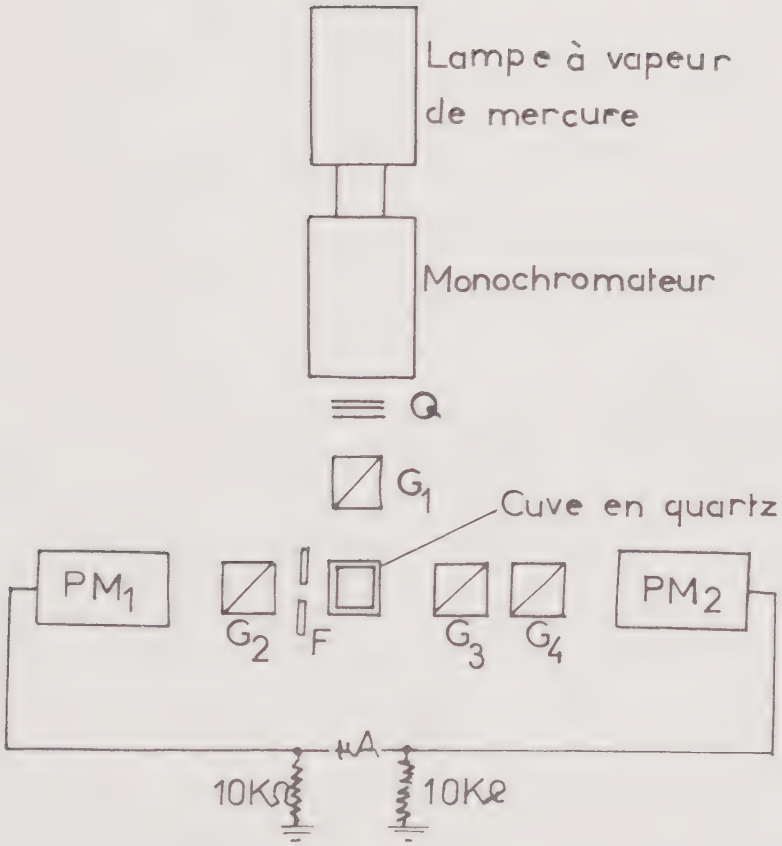

Lampe à vapeur
de mercure
Monochromateur
Q
G1
Cuve en quartz
PM1
G2
F
G3
G4
PM2
μA
10KΩ
10KΩ

Fig 20

Le dispositif expérimental utilisé, réalisé par le Dr H. Lami, est représenté sur la figure 20. La luminescence de la solution contenue dans une cuve parallélépipédique de quartz est induite par un faisceau de lumière polarisée à l'aide d'un prisme de Glan G_1, provenant d'une lampe à vapeur de mercure placée à l'entrée d'un monochromateur à réseau. L'émission de fluorescence est détectée par deux photomultiplicateurs, PM_1 et PM_2 (EMI 6256S) placés de part et d'autre de la cuve sur un axe perpendiculaire à la direction du faisceau d'excitation.
On trouve devant les photocathodes : dans la branche gauche de l'appareil, une fente réglable F et un prisme de Glan G_2 dont le plan de section principale est horizontal ; du côté droit, deux prismes de Glan G_3 et G_4 (polarisant la lumière dans un plan vertical). G_4 est solidaire d'un cercle gradué en minutes d'arc.
Les deux photomultiplicateurs sont utilisés en montage différentiel.

Le principe de la mesure est le suivant : quelle que soit l'orientation de G_1, le courant délivré par le photomultiplicateur PM_1 est proportionnel à $I_\perp$, et permettra donc d'éliminer l'influence des fluctuations d'intensité de la lampe à vapeur de mercure.
Le courant traversant le photomultiplicateur PM_2 sera par contre proportionnel à $I_\perp$ ou $I_{/\!/}$ selon que les axes optiques de G_1 et G_3 seront perpendiculaires ou parallèles.
On montre (Weber, 1956) que dans le cas d'un taux de polarisation positif, la valeur de p est donnée par la relation :

$$\frac{1}{p} = 1 + 2\frac{\cos^2\theta}{tg^2\theta}$$

dans laquelle θ représente l'angle entre les axes optiques de G_3 et G_4.
Si p est négatif on a : $p = -\frac{\sin^2\theta}{1+\cos^2\theta}$

La lumière émergeant d'un monochromateur à réseau est toujours partiellement polarisée ce qui est ici extrêmement gênant. C'est pourquoi on dispose sur le trajet du faisceau lumineux une pile de lames de quartz dont on règle l'inclinaison de manière à obtenir un faisceau émergent possédant les propriétés de la lumière naturelle.
L'interposition de filtres passe-haut Kodak-Wratten convenablement choisis entre la cuve et les photomultiplicateurs d'observation

permet d'éliminer la lumière d'excitation diffusée.
Les taux de polarisation fondamentaux des différents colorants d'acridine sont mesurés sur des solutions de colorant dans la glycérine à -65°C. On fait pour cela circuler dans le porte-cuve du méthanol refroidi à la température désirée. Cette température est mesurée à l'aide d'un thermocouple. Pour éviter lors de ces mesures la formation d'un dépôt de givre sur la cuve, on place dans l'enceinte étanche à l'intérieur de laquelle se trouve situé le porte-cuve un deshydratant (P_2O_5) dont on complète l'action à l'aide d'un manchon de cuivre rempli d'air liquide plongeant à l'intérieur de l'enceinte.

- Durée de vie

La durée de vie moyenne τ du premier état excité est déterminée par la technique du photoélectron unique décrite par Laustriat, Pfeffer, Lami et Coche (1964).
Le principe de cette technique est le suivant : on place une source de lumière pulsée (solution fluorescente excitée par des éclairs lumineux) devant un photomultiplicateur. Un circuit de coïncidences relié à une échelle de comptage permet de déterminer le nombre de coïncidences N_c par unité de temps, entre les impulsions délivrées par le détecteur et les signaux électriques synchrones de l'émission lumineuse. Un calcul simple (Pfeffer, Lami, Laustriat, Coche, 1963) conduit à la relation :

$$N_c = \nu(1 - e^{-a\bar{n}})$$

dans laquelle a représente le rendement quantique de la photocathode, et $\bar{n}$ le nombre moyen de photons atteignant celle-ci par éclair lumineux. Si la valeur du produit $a\bar{n}$ est petite par rapport à l'unité, condition que l'on réalise en diaphragmant la cathode, les impulsions délivrées par le photomultiplicateur correspondent au départ d'un seul électron de la cathode. En développant en série le second membre de cette équation et en ne retenant que le premier terme on obtient :

$$N_c \simeq \nu a\bar{n}$$

Le nombre de coïncidences N_c détectées par unité de temps est donc proportionnel à $\bar{n}$, c'est-à-dire à l'intensité de l'éclair lumineux.

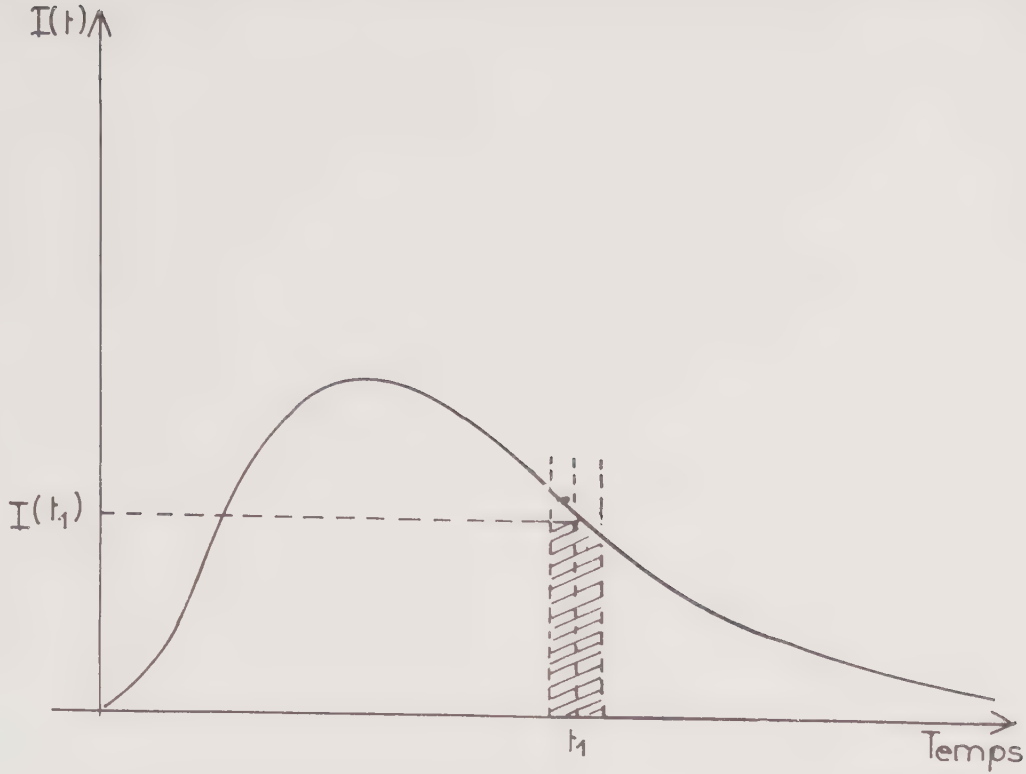


Fig 21

Envisageons le cas d'une impulsion lumineuse I(t) ayant la forme représentée sur la figure 21. Si l'on retarde d'un temps t_1 les impulsions provenant du photomultiplicateur, et si le temps de résolution (2θ) du circuit de coïncidence est nettement inférieur à la durée du phénomène lumineux étudié, le nombre $N_c(t_1)$ de coïncidences par unité de temps est proportionnel à :

$$\int_{t_1-\theta}^{t_1+\theta} I(t)dt$$

quantité que l'on peut identifier à $I(t_1)$ avec une bonne approximation si θ est suffisamment petit. Il est donc possible de reproduire la courbe I(t) en déterminant la valeur de N_c pour différents retards t_1.

Le dispositif construit dans le laboratoire de Monsieur le Professeur Laustriat, réalise cette opération à l'aide d'un convertisseur temps-amplitude (temps de résolution 3.10^{-11} s) relié à un sélecteur d'amplitude à 400 canaux permettant d'obtenir la courbe I(t) cherchée.

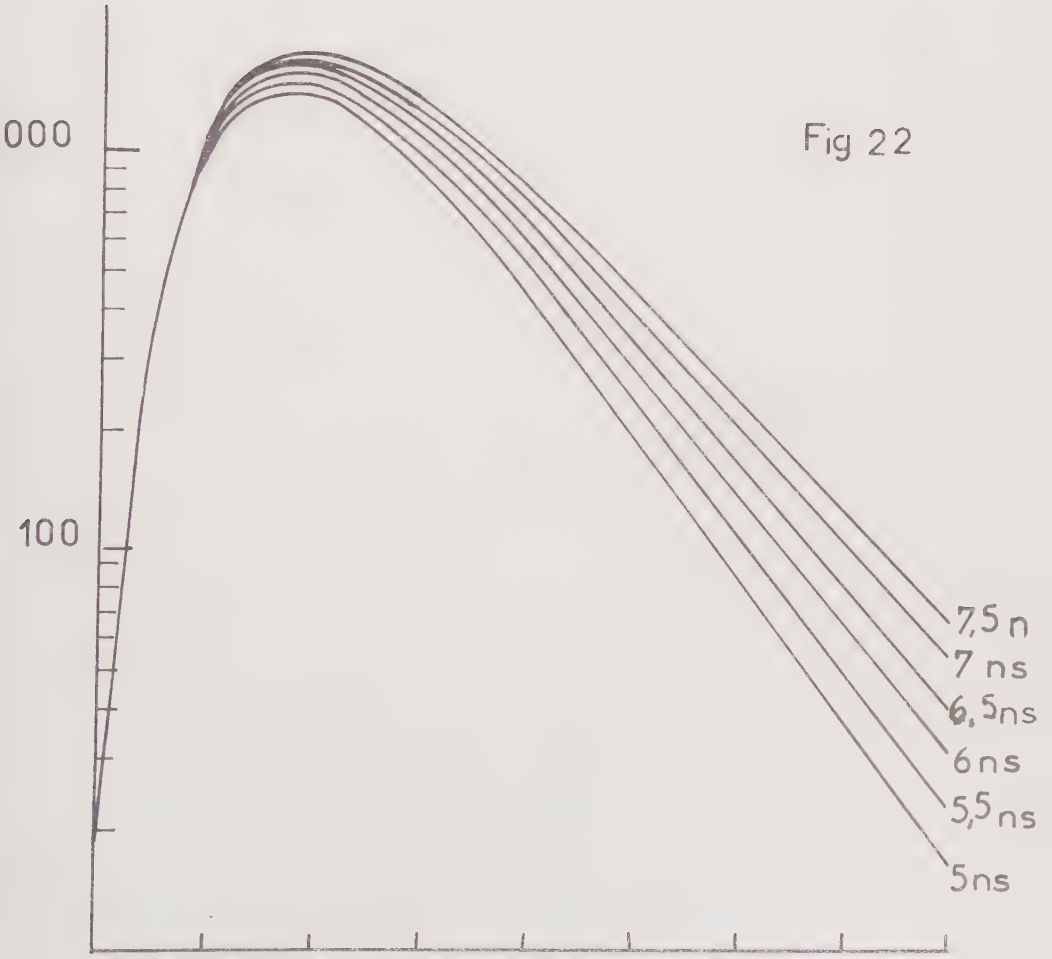
La fluorescence de la solution est excitée par un bref éclair lumineux issu d'un tube à décharge placé à l'entrée d'un monochromateur. L'émission de fluorescence observée par réflexion est détectée par un photomultiplicateur rapide (56 UVP Dario) devant lequel sont disposés un diaphragme et un filtre (interférentiel ou Kodak-Wratten) destiné à éliminer la lumière excitatrice diffusée par la face avant de la cuve. Lorsque le diaphragme est suffisamment fermé on se trouve dans les conditions d'émission du photoélectron unique.

L'appareil permet ainsi d'obtenir la distribution H(t) du nombre d'impulsions électriques. Cette distribution est le produit de composition défini par la relation :

$$H(t) = E(t) * R(t) * I(t)$$

dans laquelle E(t) représente la densité de probabilité d'émission d'un photon à l'instant t par le tube à décharge, I(t) la loi de l'émission lumineuse de la solution fluorescente et R(t) la fonction de réponse du dispositif.

Fig. 22. Courbes H(t) calculées pour différentes valeurs de τ.



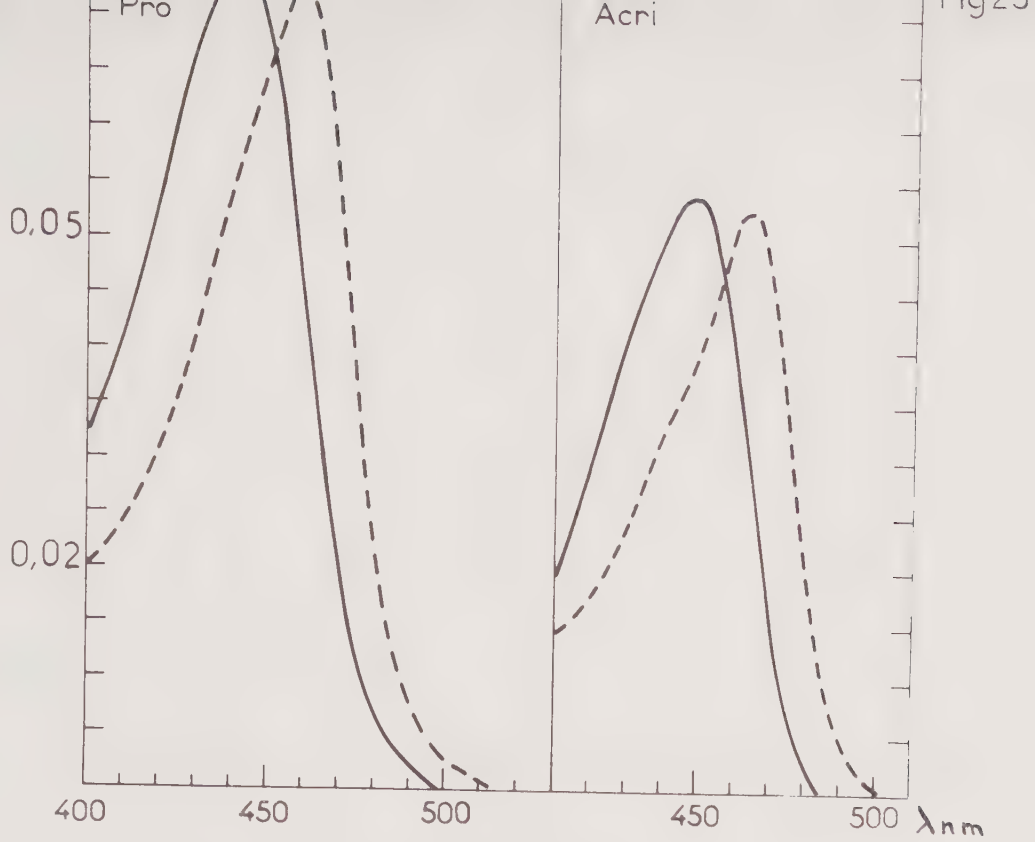


Fig. 23. Spectres d'absorption des complexes Pro-dAT et Acri-dAT.
10^{-3} M $NaClO_4$; (dAT) = 2.10^{-4} M en P ;(colorant) = 2.10^{-6}M
——— colorant seul ----- colorant-dAT

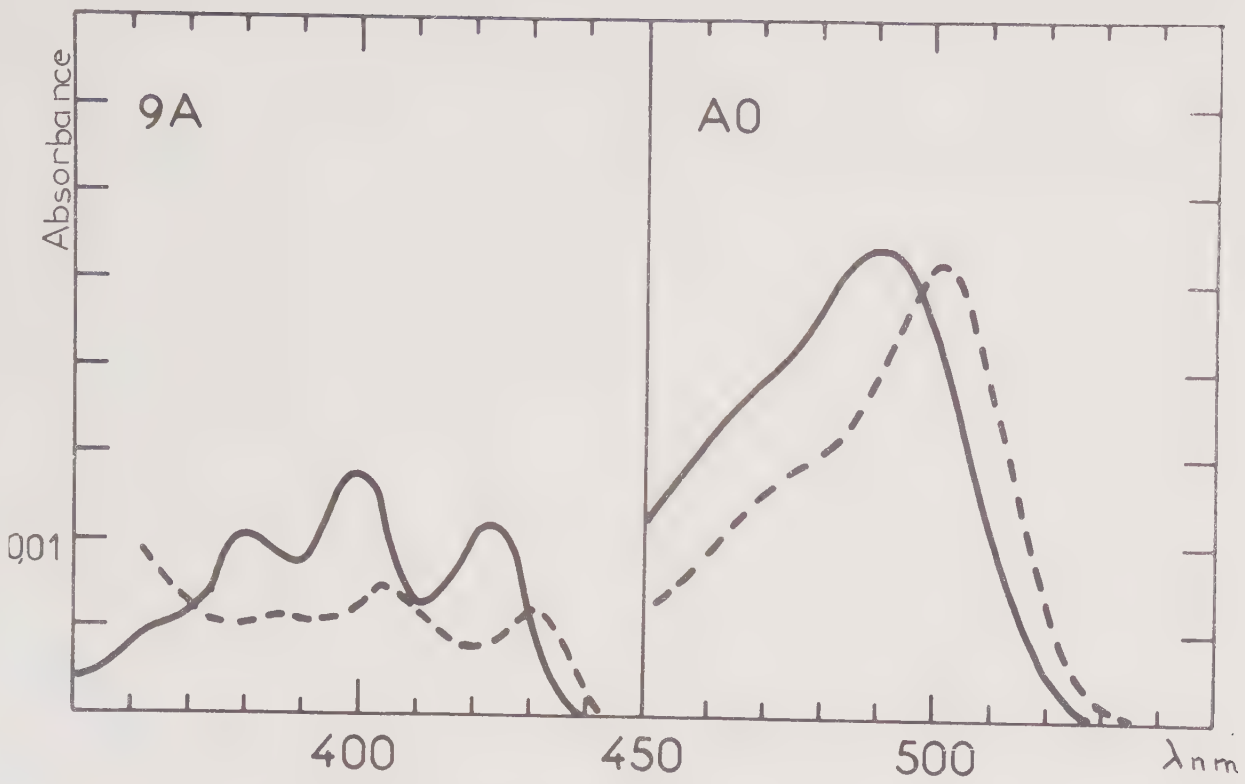
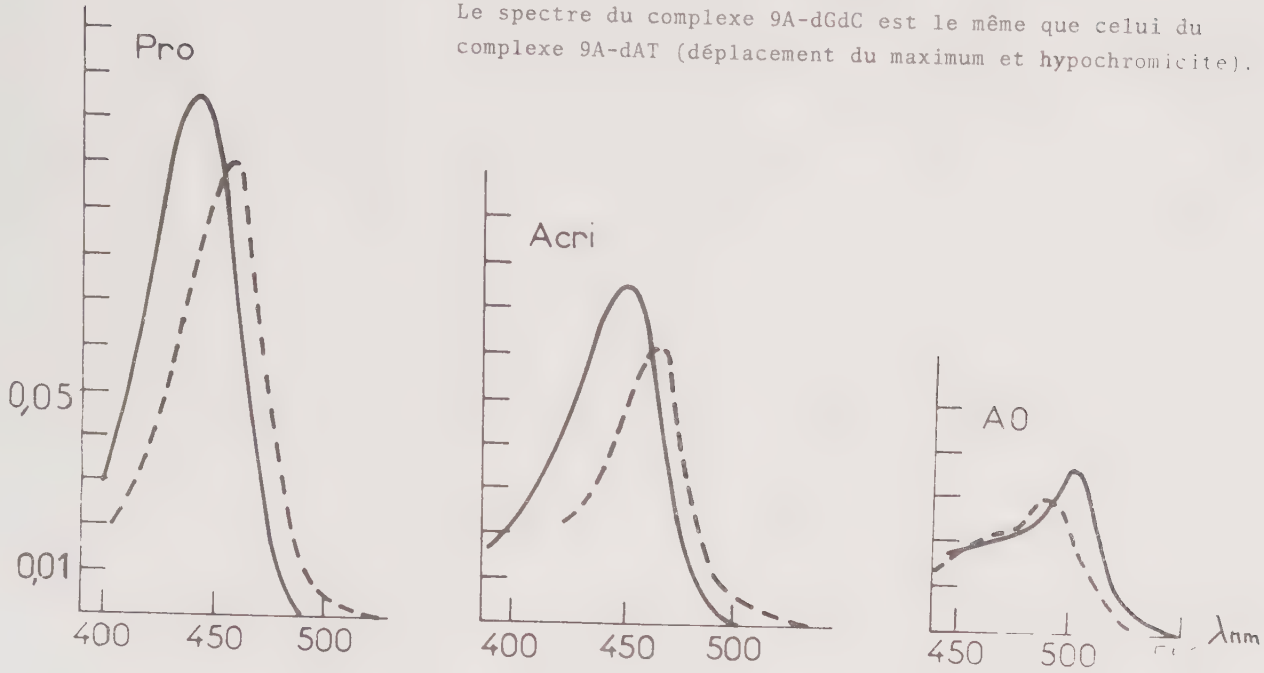


Fig. 24. Spectres d'absorption des complexes AO-dAT et 9A-dAT.
(les concentrations sont les mêmes que celles de la figure 23).

Fig 25

Fig. 25. Spectres d'absorption des complexes colorant-dGdC.
(dGdC) = 4.10^{-4} M en P ; (colorant) = 3.10^{-6} M
Le spectre du complexe 9A-dGdC est le même que celui du complexe 9A-dAT (déplacement du maximum et hypochromicite).



Pour déterminer I(t), on remplace dans une deuxième mesure la cuve contenant la solution par une surface réfléchissante (aluminium poli). L'appareil permet alors de tracer une distribution G(t) qui correspond à la convolution des fonctions E(t) et R(t). On écrit alors :

$$H(t) = G(t) * I(t)$$

Si I(t) est de la forme $I(t) = I_o e^{-t/\tau}$, ce qui est le cas pour les solutions fluorescentes diluées, deux méthodes simples peuvent être utilisées pour déterminer la constante de temps.
La première consiste à mesurer l'intervalle de temps Δt séparant les barycentres des distributions H(t) et G(t), lequel est égal à τ (Bay, 1950).
On peut aussi calculer numériquement le produit de composition $G(t) * e^{-t/\tau}$ pour différentes valeurs de τ, en retenant finalement celle pour laquelle on obtient le meilleur accord avec la courbe H(t) expérimentale.
C'est cette deuxième méthode que nous avons utilisée dans notre travail. Sur la figure 22 sont représentées les courbes H(t) calculées pour différentes valeurs de τ. La comparaison de ce type de courbe avec la courbe expérimentale permet d'obtenir la valeur d'une durée de vie avec une précision de l'ordre de 0,3 ns.

b) Résultats expérimentaux

1) Spectres d'absorption

Les figures 23, 24 et 25 représentent les spectres d'absorption obtenus pour les différents complexes colorant-polydésoxyribonucléotide. Nous avons fait figurer à côté de chacun d'eux les spectres d'absorption correspondant au colorant seul examiné dans les mêmes conditions. On constate, et plus particulièrement pour les complexes colorant-dGdC, une légère diminution de ε à la longueur d'onde du maximum d'absorption, accompagnée d'un déplacement de ce maximum vers les grandes longueurs d'onde. La diminution de ε_{max} observée est très nette dans le cas des complexes de la 9-aminoacridine.

2) Spectres d'émission de fluorescence

Les figures 26 et 27 représentent les spectres d'émission de fluorescence observés pour les différents complexes colorant-polydésoxyribonucléotide. Tout comme pour les spectres d'absorption, nous avons fait figurer à côté de chacun d'entre eux le

Pour déterminer I(t), on remplace dans une deuxième mesure la cuve contenant la solution par une surface réfléchissante (aluminium poli). L'appareil permet alors de tracer une distribution G(t) qui correspond à la convolution des fonctions E(t) et R(t). On écrit alors :

$$H(t) = G(t) * I(t)$$

Si I(t) est de la forme $I(t) = I_o e^{-t/\tau}$, ce qui est le cas pour les solutions fluorescentes diluées, deux méthodes simples peuvent être utilisées pour déterminer la constante de temps.
La première consiste à mesurer l'intervalle de temps Δt séparant les barycentres des distributions H(t) et G(t), lequel est égal à τ (Bay, 1950).
On peut aussi calculer numériquement le produit de composition $G(t) * e^{-t/\tau}$ pour différentes valeurs de τ, en retenant finalement celle pour laquelle on obtient le meilleur accord avec la courbe H(t) expérimentale.
C'est cette deuxième méthode que nous avons utilisée dans notre travail. Sur la figure 22 sont représentées les courbes H(t) calculées pour différentes valeurs de τ. La comparaison de ce type de courbe avec la courbe expérimentale permet d'obtenir la valeur d'une durée de vie avec une précision de l'ordre de 0,3 ns.

b) Résultats expérimentaux

1) Spectres d'absorption

Les figures 23, 24 et 25 représentent les spectres d'absorption obtenus pour les différents complexes colorant-polydésoxyribonucléotide. Nous avons fait figurer à côté de chacun d'eux les spectres d'absorption correspondant au colorant seul examiné dans les mêmes conditions. On constate, et plus particulièrement pour les complexes colorant-dGdC, une légère diminution de ε à la longueur d'onde du maximum d'absorption, accompagnée d'un déplacement de ce maximum vers les grandes longueurs d'onde. La diminution de ε_{max} observée est très nette dans le cas des complexes de la 9-aminoacridine.

2) Spectres d'émission de fluorescence

Les figures 26 et 27 représentent les spectres d'émission de fluorescence observés pour les différents complexes colorant-polydésoxyribonucléotide. Tout comme pour les spectres d'absorption, nous avons fait figurer à côté de chacun d'entre eux le

Fig 25

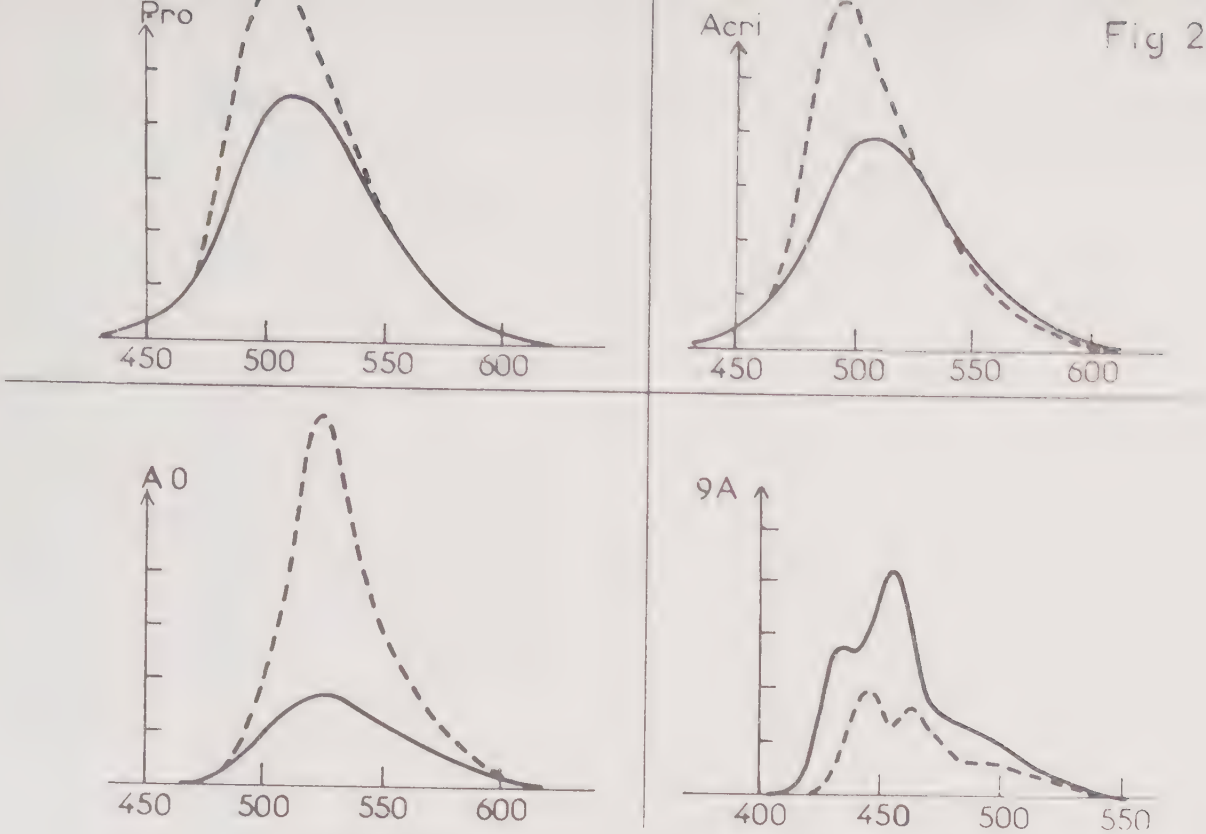


Fig. 26. Spectres d'émission de fluorescence des complexes colorant-dAT;pour les complexes Pro-dAT, Acri-dAT, AO-dAT la longueur d'onde d'excitation est celle du point isobestique ; pour le complexe 9A-dAT, la longueur d'onde d'excitation est de 400 nm.

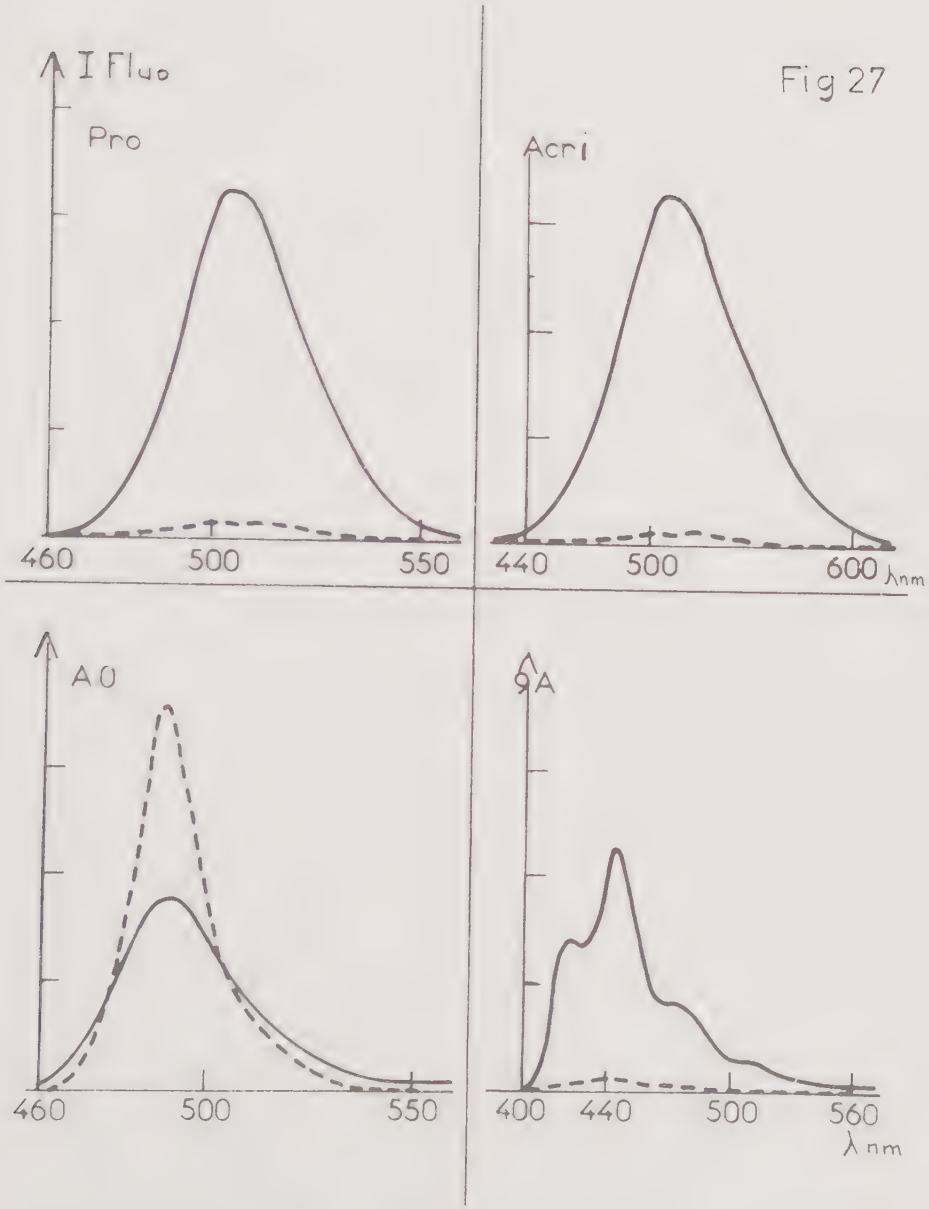


Fig. 27. Spectres d'émission de fluorescence des complexes colorant-dGdC. L'excitation est faite au point isobestique. Le spectre du complexe AO-dGdC est réduit d'un facteur 2,5.

spectre d'émission du colorant libre correspondant observé dans les mêmes conditions.
Nous constatons trois types de comportements différents. Dans le premier cas, on observe une augmentation du rendement quantique de fluorescence du complexe par rapport à celui du colorant libre, accompagnée d'un déplacement du maximum d'émission vers le bleu (petites λ). Sont dans ce cas les complexes :
Pro-dAT, Acri-dAT, AO-dAT, AO-dGdC.
Dans le deuxième cas, on observe une diminution considérable du rendement quantique de fluorescence du complexe par rapport à celui du colorant libre. Sont dans ce cas les complexes :
9A-dGdC, Pro-dGdC, Acri-dGdC pour lesquels le rendement de fluorescence est voisin de zéro.
Dans le cas du complexe 9A-dAT enfin, on n'observe aucune modification significative du rendement quantique ; le maximum du spectre d'émission est décalé vers le rouge.

3) Mesures d'inhibition de fluorescence par KI

Les études de différents auteurs (Thomès et col., 1969) montrent, qu'intercalées entre les plateaux de bases, les molécules de colorant sont inaccessibles à l'iodure de potassium.
Nous avons étudié l'influence de l'addition de KI à nos solutions sur nos spectres d'émission de fluorescence. Après avoir déterminé pour chaque colorant la concentration en KI nécessaire pour diminuer de moitié l'intensité de fluorescence du colorant libre, nous avons observé les variations des spectres d'émission de fluorescence des complexes colorant-polymère dans les mêmes conditions.
L'addition de KI n'a aucun effet sur les spectres d'émission des complexes : Pro-dAT, Acri-dAT, AO-dAT, AO-DGdC, 9A-dAT.
Par contre on observe sur les complexes 9A-dGdC, Pro-dGdC, Acri-dGdC une diminution de la fluorescence résiduelle. Cette dernière est néanmoins trop faible pour nous permettre de vérifier que cette extinction de fluorescence obéit bien à une loi de Stern-Volmer. L'émission résiduelle est fort probablement due dans le cas de ces complexes à du colorant fixé sur des portions en simple brin du dGdC. Nous avons en effet mentionné plus haut que ce dGdC contenait des proportions légèrement différentes de guanine

Tableau VI - Taux de polarisation

λ nm	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Pro + dAT 20°C					0,30	0,30	0,30	0,30	0,305		0,305
AC + dAT 20°C					0,285		0,287	0,292		0,292	0,31
AO + dAT 20°C									0,32	0,32	0,32
9A + dAT 20°C	0,15	0,15	0,18	0,19	0,24	0,31					
AO + dGdC 20°C									0,36	0,36	0,36
Pro -65°C						0,41	0,41				
AC -65°C						0,41	0,41				
9A -65°C	0,375	0,38	0,38	0,38	0,375						
AO -65°C										0,42	

et de cytosines : la présence de régions non appariées peu suffire à expliquer : i) la fluorescence résiduelle, ii) le fait que le colorant fixé en ces sites soit accessible à KI.

4) Mesure des taux de polarisation de fluorescence

Le tableau VI nous donne les valeurs des taux de polarisation des différents complexes colorant-polydésoxyribonucléotide, obtenus à 25°C pour différentes longueurs d'onde de la lumière d'excitation. Nous avons fait figurer sur le même tableau les valeurs des taux de polarisation fondamentaux obtenues pour ces mêmes colorants en milieu rigide.
L'addition de KI aux solutions étudiées ne modifie pas les valeurs des taux de polarisation obtenues pour les complexes : Pro-dAT, Acri-dAT, AO-dAT, AO-dGdC, 9A-dAT.

L'examen de ce tableau appelle différentes constatations :

- pour les complexes colorant-dAT le taux de polarisation mesuré est sensiblement le même quel que soit le colorant utilisé. Dans le cas du complexe 9A-dAT, le taux de polarisation n'atteint une valeur équivalente à celle des autres complexes colorant-dAT que lorsque l'excitation de l'émission de fluorescence se fait en dehors de la zone où absorbe le colorant libre. Dans ce cas précis, la présence du colorant libre perturbe donc suffisamment l'émission de fluorescence pour que les taux de polarisation mesurés varient avec la longueur d'onde d'excitation. En décalant cette dernière vers le rouge, on diminue la contribution à l'émission de fluorescence du colorant libre, la majorité des photons d'excitation étant alors absorbés par le complexe dont le spectre d'absorption est décalé vers les grandes longueurs d'onde.
Notons encore que pour ce complexe et à une longueur d'onde donnée l'ε du colorant lié, a une valeur deux fois moindre que l'ε du colorant libre. Dans ces conditions, le rapport des photons absorbés par le colorant libre sur les photons absorbés par le colorant lié est supérieur au rapport concentration du colorant libre sur concentration du colorant lié, favorisant par là même l'émission du colorant libre. C'est là une explication possible des valeurs des taux de polarisation mesurés pour le complexe 9A-dAT. Dans la discussion de nos résultats nous envisagerons une autre explication possible..

- Dans le cas de l'acridine orange, seul colorant à présenter des propriétés de fluorescence voisines dans ses complexes avec le dAT ou le dGdC, le taux de polarisation mesuré est supérieur pour le complexe AO-dGdC à celui mesuré pour le complexe AO-dAT. Nous reviendrons sur cette constatation dans la discussion de nos résultats.

- Dans tous les cas enfin, les taux de polarisation mesurés pour nos complexes colorants-polydésoxyribonucléotides sont inférieurs aux taux de polarisation fondamentaux mesurés pour ces mêmes colorants en milieu rigide.

5) Mesure des durées de vie de fluorescence

La desexcitation radiative d'une molécule se trouvant dans son premier état singulet peut être caractérisée par la durée de vie radiative τ_o (vie moyenne en l'absence de desexcitation non radiative) définie par la relation :

$$\tau_o = \frac{1}{k_f}$$

où k_f représente la probabilité par unité de temps pour qu'une molécule excitée émette un photon. La valeur de τ_o peut être déterminée expérimentalement de deux manières. La première consiste à mesurer le rendement quantique de fluorescence η et la durée moyenne d'émission τ, ces grandeurs étant liées par la relation :

$$\tau_o = \frac{\tau}{\eta}$$

Nous pouvons calculer à partir de ces valeurs le rapport entre les durées de vie radiatives τ_o et $\tau_{o,1}$ du colorant fixé et du colorant libre. Ce rapport $\tau_o/\tau_{o,1}$ sera égal à 1 si l'espèce qui émet est la même dans les deux cas.

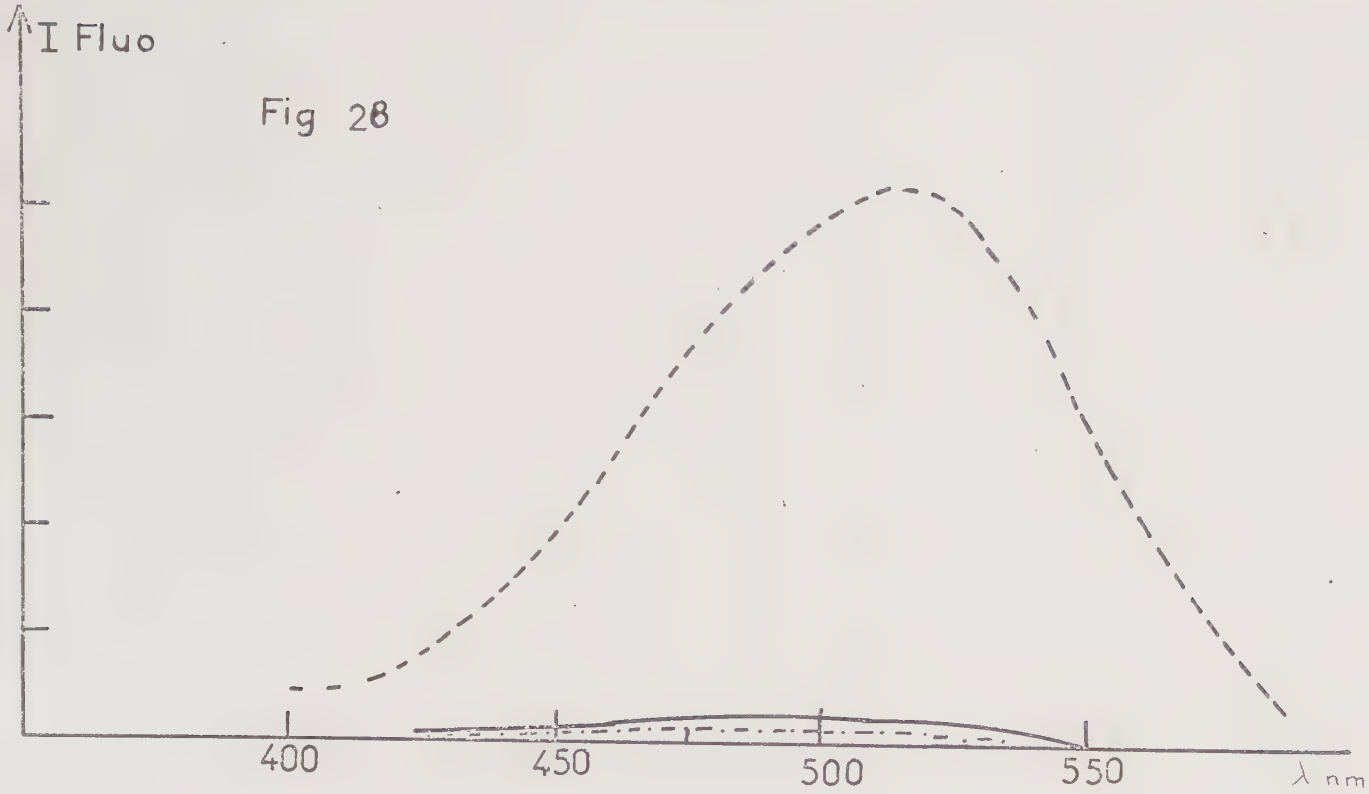
On peut également déterminer τ_o en utilisant les spectres d'absorption. Einstein a montré qu'il existait une relation entre les probabilités par unité de temps d'absorption et d'émission spontanée d'un photon par une molécule ou un atome. Dans le cas particulier d'une molécule, il est donc possible d'exprimer τ_o en fonction du coefficient d'extinction moléculaire ε.
Förster (1951) a proposé une formule dont la démonstration exige l'existence d'une symétrie miroir entre spectre d'émission et d'absorption. Une expression plus rigoureuse a été établie par

Tableau VII

		Pro	AC	AO	9A
Colorant	τ_1	4 ns	4,2	1,75	16
Colorant + dAT	τ	5,7	5,3	6,2	29
	τ/τ_1	1,42	1,26	3,5	1,8
	η/η_1	1,32	1,25	3,4	≃1
	$\tau_o/\tau_{o,1}$	0,99	0,99	1	0,97
Colorant + dGdC	τ	-	-	7	-
	τ/τ_1	-	-	4	-
	η/η_1	≃0	≃0	4,15	≃0
	$\tau_o/\tau_{o,1}$	-	-	0,94	-

——— colorant seul -.-.-.-. BET-dGdC

Nous avons porté en tireté (----) le spectre d'émission correspondant du complexe BET-DNA.



Strickler et Berg (1962) qui ont montré que pour des molécules dont la disposition des noyaux varie peu lors d'une transition fortement permise, la valeur de τ_o est donnée par la relation :

$$\frac{1}{\tau_o} = 2{,}88.10^{-9}\ n^2\ (\bar{\nu}_f^{-3})^{-1} \int \frac{\varepsilon(\bar{\nu})}{\bar{\nu}}\ d\bar{\nu}$$

dans laquelle l'intégrale est étendue à la première bande d'absorption, et n représente l'indice de réfraction du milieu entourant la molécule fluorescente.
La quantité $(\bar{\nu}_f^{-3})^{-1}$ est définie par l'expression :

$$(\bar{\nu}^{-3})^{-1} = \frac{F(\bar{\nu})d\bar{\nu}}{F(\bar{\nu})\bar{\nu}^{-3}\ d\bar{\nu}}$$

où $F(\bar{\nu})$ représente l'intensité de fluorescence en fonction du nombre d'onde. On calcule à partir de cette expression le rapport $\tau_o/\tau_{o,1}$.
Les valeurs des temps de vie de fluorescence des différents complexes colorants-polydésoxyribonucléotides figurent dans le tableau VII. Nous y avons fait figurer de plus :

- les rapports existant entre la durée de vie du colorant fixé au polydésoxyribonucléotide et celle du colorant libre : τ/τ_1.
- Les rapports existant entre les rendements quantiques de fluorescence du colorant fixé et du colorant libre : η/η_1
- les valeurs de $\tau_o/\tau_{o,1}$ calculées à partir de la formule de Strickler et Berg.

Nous constatons que pour les complexes Pro-dAT, Acri-dAT, AO-dAT, 9A-dAT, AO-dGdC, l'émission de fluorescence semble due à la même espèce.

6) Le Bromure d'éthidium

Ses propriétés de fluorescence ont bien été étudiées par Le Pecq et Paoletti (1967) tant avec le DNA qu'avec les polynucléotides. Néanmoins, afin de vérifier certaines de nos hypothèses, nous avons mesuré les caractéristiques de fluorescence du BET en présence de dGdC dans les mêmes conditions que précédemment. Aux valeurs de P/D utilisées la fluorescence du complexe BET-dGdC est nulle. La figure 28 montre les spectres de fluorescence du BET et de son complexe avec le dGdC.

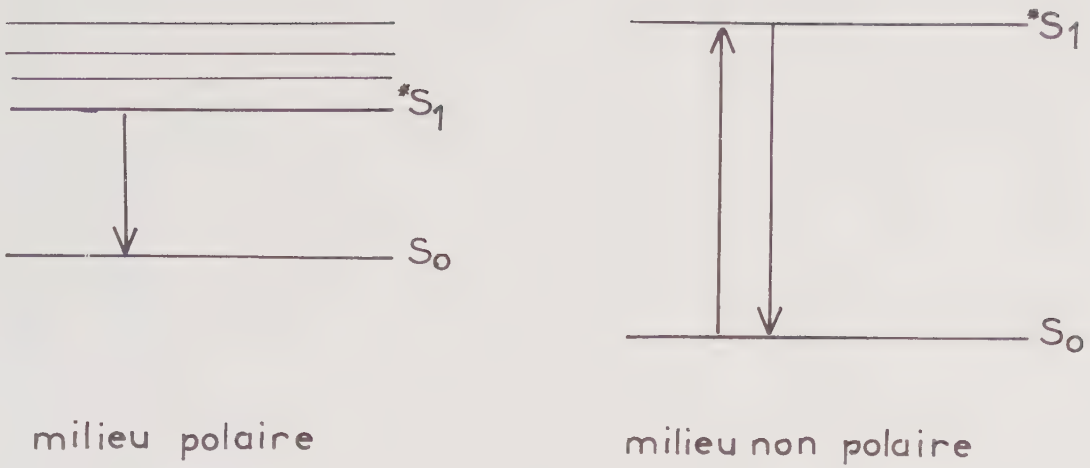


Fig. 29. Niveaux d'énergie de l'état fondamental S_0 et du premier état singulet excité S_1 du colorant, en milieu polaire et en milieu non polaire. La série des niveaux situés au-dessus de S_1 correspond à la réorientation de nombres différents de molécules de solvant autour de la molécule excitée, et donc à différents déplacements du maximum d'émission de fluorescence.

c) Discussion

Nous pouvons, au vu des résultats précédents, distinguer dans les interactions colorants-polydésoxyribonucléotides deux types de complexes de nature différente.

1) Dans le premier nous rangerons les complexes : Pro-dAT, Acri-dAT, AO-dAT, AO-dGdC et 9A-dAT. Ils présentent :

- un maximum d'absorption décalé vers les grandes longueurs d'onde (rouge),
- un maximum d'émission de fluorescence décalé vers les petites longueurs d'onde (bleu),
- un rendement quantique de fluorescence augmenté et tendant vers l'unité, si l'on se réfère aux valeurs données dans la littérature pour les rendements quantiques de fluorescence des colorants libres,
- des valeurs de taux de polarisation élevées correspondant à l'insertion du colorant dans le polydésoxyribonucléotide,
- une durée de vie variant comme le rendement quantique,
- des caractéristiques de fluorescence (rendement, durée de vie, taux de polarisation) non modifiées par l'addition de KI.

Les différences de propriétés de fluorescence entre colorant libre et colorant fixé peuvent s'interpréter en termes de polarité du milieu : le passage d'un milieu polaire hydrophile à un milieu non polaire hydrophobe (le polydésoxyribonucléotide dans notre cas) modifie les propriétés de fluorescence dans le sens observé. Le simple décalage du spectre d'absorption vers le rouge expliquerait déjà que même sans modification de l'énergie du premier état excité le spectre de fluorescence soit décalé vers le bleu.
De plus, selon Eisinger et Navon (1969) le niveau d'énergie du premier état excité d'une molécule est plus faible en milieu polaire qu'en milieu non polaire. Cet abaissement du niveau d'énergie de l'état excité (figure 29) résulte de la réorientation des molécules de solvant autour de la molécule excitée : il est d'autant plus important que le nombre de molécules qui se réorientent pendant la durée de vie de l'état excité est grand. Il dépend donc de la viscosité et de la température du solvant. Pour différents composés fluorescents, le déplacement du maximum d'émission vers le bleu lors du passage d'un milieu polaire (l'eau) à un milieu non

Tableau VIII

Longueur d'onde des maxima
d'émission de fluorescence (en nm)

	Pro	Acri	AO	9A		
Colorant seul	510	505	530	425	450	480
Colorant + dAT	500	495	526	440	462	492
Colorant + dGdC			526			

polaire (le polymère) sera donc d'autant plus marqué (toutes conditions étant égales par ailleurs), que la durée de vie du colorant excité en milieu polaire sera grande. Le tableau VIII nous donne les maxima d'émission des différents colorants dans les deux milieux. Nous y constatons bien, que l'acridine orange dont la durée de vie est très courte ne voit son maximum que faiblement décalé lors du passage d'un milieu à l'autre. La 9-aminoacridine par contre voit le maximum de son émission de fluorescence décalé vers le rouge lors de sa fixation sur le polymère. Pour expliquer ce résultat nous pouvons avancer l'hypothèse suivante : bien que fixée sur le polymère, la 9-aminoacridine reste accessible aux molécules d'eau. La durée de vie de la 9-A étant plus grande une fois celle-ci fixée sur le polymère, le réarangement des molécules d'eau autour de la molécule excitée est plus important que pour la 9-A dans l'eau et le niveau d'énergie de l'état excité s'en trouve diminué.

C'est peut-être là l'explication réelle des faibles valeurs trouvées pour les taux de polarisation du complexe 9A-dAT et non pas celle que nous avions avancée dans l'exposé de nos résultats expérimentaux.

L'augmentation du rendement quantique de fluorescence peut être attribuée au fait qu'en intercalant le colorant dans le polymère, on diminue la probabilité de desexcitation non radiative.

2) 9A-dGdC, Pro-dGdC, Acri-dGdC, BET-dGdC forment le deuxième type de complexe. Ils présentent tous :

- un maximum d'absorption décalé vers les grandes longueurs d'onde,
- un rendement quantique de fluorescence voisin de zéro.

La faible émission de fluorescence observée pour ces différents complexes est probablement due au fait que le dGdC étudié comportait un léger excès de guanines (52% G contre 48% C). De ce fait il subsiste en plus des paires GC du dGdC un certain nombre de bases non appariées. Le colorant fixé sur ces dernières pourra présenter alors une émission de fluorescence. Cette faible émission de fluorescence résiduelle est d'ailleurs sensible à l'addition de KI, ce qui montre bien qu'elle n'est pas due à du colorant intercalé dans une double hélice.

. Fig 30

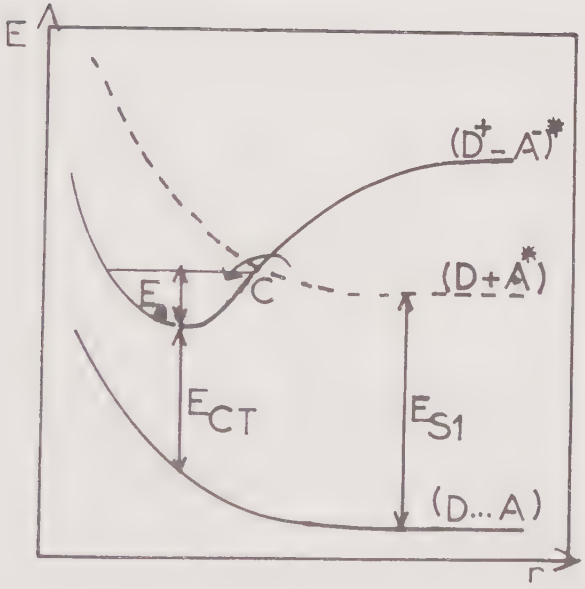


Fig. 30. E_{S1} = énergie d'excitation électronique de l'accepteur.
E_{CT} = énergie d'excitation du complexe par transfert de charge.
E_a - énergie d'activation.

Extinction de fluorescence par formation d'un complexe à transfert de charge

Rappelons qu'un complexe à transfert de charge se forme entre deux molécules, un donneur d'électrons et un accepteur, lorsqu'il y a excitation électronique de l'un des partenaires du complexe vers l'autre.

Les facteurs influençant ce processus, sont d'une part l'énergie d'ionisation I_d de la molécule qui cède l'électron (donneur) et d'autre part, l'affinité électronique de l'accepteur A_e. La première de ces quantités représente l'énergie nécessaire pour arracher un électron d'une molécule à l'état fondamental, la seconde l'énergie libérée lorsqu'un électron libre vient occuper la première orbitale vide d'une molécule neutre. La relation de Mulliken nous donne l'énergie d'excitation électronique du complexe à transfert de charge E_{CT} :

$$E_{CT} = I_d - A_e - E_c$$

où E_c représente l'énergie d'interaction coulombienne entre les deux ions du complexe. Pour un système donneur-accepteur, E_{CT} peut être déterminé grâce à la bande caractéristique du complexe à transfert de charge qui apparait dans le spectre d'absorption. L'étude des spectres d'absorption de nos solutions colorant-dGdC n'ayant pas révélé la bande d'absorption caractéristique des complexes à transfert de charge stables à l'état fondamental, nous expliquons l'extinction de fluorescence par le schéma de la figure 30.

Nous y avons représenté la variation de l'énergie potentielle du système donneur-accepteur (D-A) en fonction de la distance intermoléculaire r. Le niveau fondamental du complexe à transfert de charge a été représenté comme non attractif. Le niveau du premier état excité de ce complexe $(D\text{-}A)^*$ a par contre été représenté comme attractif. Les traits pointillés se rapportent à l'ensemble (D+A) non complexé lorsque A^* se trouve dans son premier état singulet.

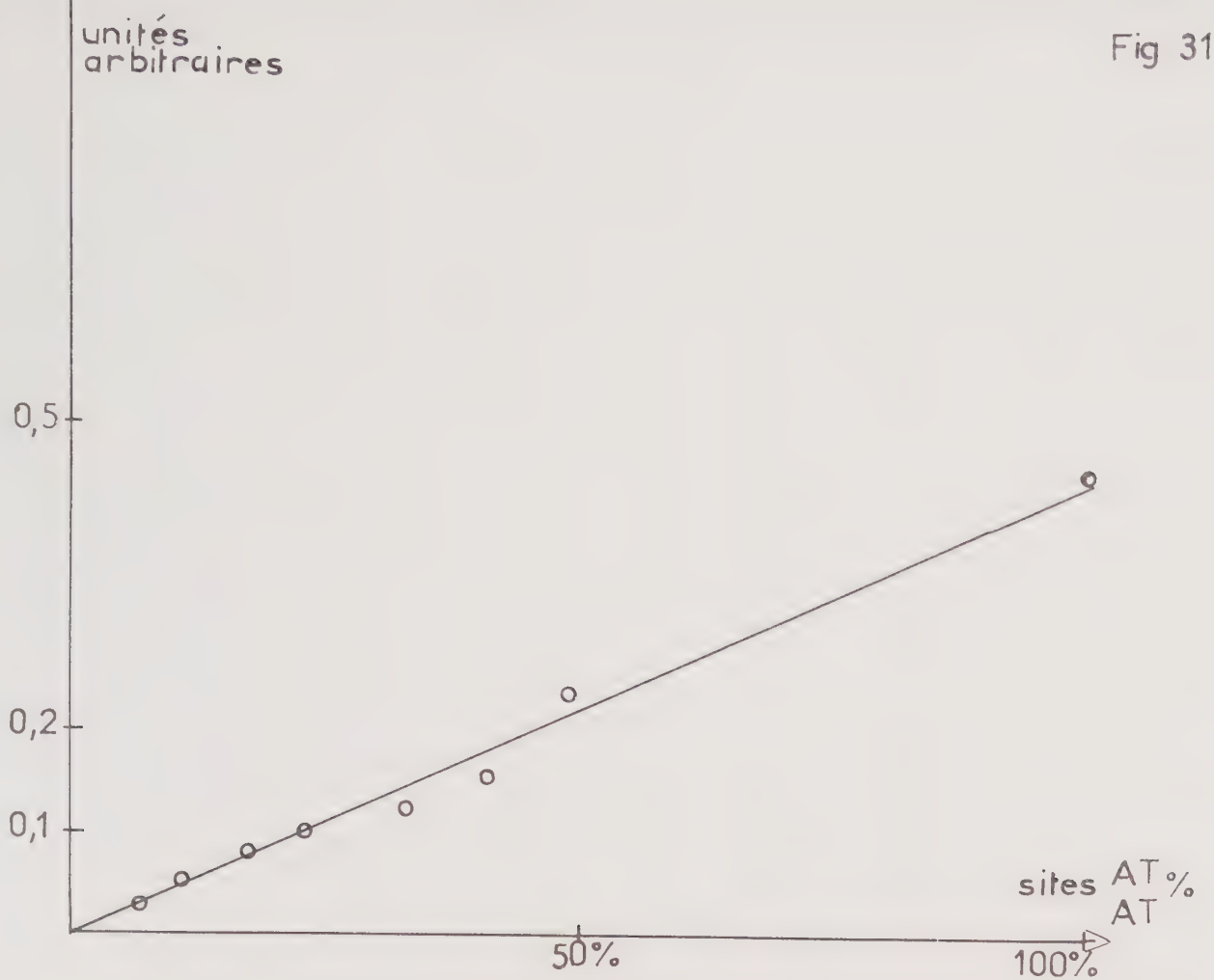
Mulliken (1964) avait proposé un diagramme analogue pour expliquer l'origine des complexes par transfert de charge "de contact", lesquels instables à l'état fondamental, ne se forment que si un couple D-A transitoire (résultant d'une simple rencontre moléculaire) absorbe un photon d'énergie E_{CT}.

Tableau IX

Energies des orbitales moléculaires en unités β

Pro		AO	9A	AT	GC
HOMO	0,396	0,657	0,354	0,425	0,288
LEMO	-0,408	-0,278	-0,476	-0,874	-0,782

Fig 31



L'examen du diagramme montre que le complexe se formera directement dans son premier état excité si son énergie E_{CT} est inférieure à E_{S_1} . Après formation de $(D^+-A^-)^*$ et dissipation de l'excès d'énergie de vibration (E_a) au cours de chocs avec les molécules voisines, l'énergie d'excitation se trouve piégée sur le complexe. L'efficacité de cette capture et par conséquent l'efficacité de l'extinction de fluorescence dépend de la valeur de E_a, c'est-à-dire de la position du point C par rapport au fond du puits de potentiel de l'état $(D^+-A^-)^*$. Pour une molécule excitée d'énergie E_{S_1} déterminée, la probabilité de formation du complexe à transfert de charge excité sera d'autant plus grande que le niveau d'énergie de $(D^+-A^-)^*$ sera plus bas.

Il résulte de ces considérations et de l'expression de E_{CT} que l'extinction de fluorescence sera d'autant plus efficace :

- que l'énergie d'ionisation du donneur sera plus faible,
- et que l'affinité électronique de l'accepteur sera plus grande.

En excitant l'accepteur on augmente probablement son affinité électronique permettant ainsi la formation du complexe à transfert de charge.

Dans notre cas les paires GC joueront le rôle de donneur d'électron et les molécules de colorant celui d'accepteur. Les calculs théoriques effectués par Pullman et Pullman (1964) nous donnent les énergies de :

- la plus haute orbitale moléculaire occupée (HOMO)
- la plus basse orbitale moléculaire vide (LEMO),

et ce pour les paires AT et GC d'un DNA ainsi que pour certains de nos colorants (Pro, AO, 9A). Ces valeurs sont reproduites dans le tableau IX. La comparaison des valeurs des HOMO pour les paires GC et AT en nous permettant d'évaluer leur potentiel d'ionisation, nous montre comme l'avait déjà souligné Pullman, que les paires GC peuvent jouer le rôle de donneurs d'électrons.
La comparaison des valeurs des LEMO pour les différents colorants nous permet d'avoir une idée des valeurs respectives de leurs affinités électroniques : on constate que la 9A constitue le meilleur accepteur d'électron devant la Pro et AO.

Nos résultats, impliquant la formation d'un complexe à transfert de charge uniquement entre 9A et dGdC, Pro et dGdC, Acri

et dGdC sont donc parfaitement compatibles avec les données théoriques (AO est en effet le plus mauvais accepteur). Les auteurs cités plus haut ne donnent pas les énergies calculées des orbitales moléculaires pour l'acriflavine et le bromure d'éthidium ; on peut néanmoins supposer que ces deux produits ont une affinité électronique leur permettant de former à l'état excité un complexe à transfert de charge avec les plateaux GC.

L'existence des deux types de complexes mentionnés ici, rend bien compte des variations du rendement quantique d'un colorant comme la proflavine fixé sur des DNA de composition en bases différentes (Chan et Van Winckle, 1969). La proflavine fixée sur un DNA va pouvoir :

- soit être "allumée" : son rendement quantique de fluorescence sera alors celui de la proflavine fixée sur du dAT,
- soit être "éteinte" : son rendement quantique de fluorescence sera nul.

L'extinction de fluorescence se produira lorsqu'il y aura formation d'un complexe à transfert de charge entre le colorant et une paire GC, c'est-à-dire en première approximation lorsque le colorant sera intercalé à côté d'une paire GC. Si notre hypothèse est correcte et si l'affinité de la proflavine pour les différents types de sites présents sur un DNA reste à peu près la même, le rendement quantique de fluorescence variera linéairement en fonction du pourcentage de sites $\frac{AT}{AT}$ présents dans les différents DNA étudiés. C'est ce que nous constatons effectivement sur la figure 31 tracée à partir des résultats de Chan et Van Winckle. Ces résultats sont en accord avec nos propres mesures réalisées sur du DNA de thymus de veau et de Micrococcus lysodeikticus.

La différence entre le taux de polarisation du BET intercalé dans un DNA et le taux de polarisation fondamental de ce même colorant a été interprétée par Wahl, Paoletti et Le Pecq (1970) comme une preuve de ce qu'ils ont appelé la "respiration du DNA". Si nous examinons les valeurs des taux de polarisation mesurées pour un colorant comme l'acridine orange nous constatons que la valeur de p est plus basse (0,305) pour le complexe AO-dAT et plus haute (0,36) pour le complexe AO-dGdC que pour le complexe AO-DNA (0,32)

La température de fusion de ces trois polymères augmente lorsque l'on passe du dAT au DNA et du DNA au dGdC. En d'autres termes, la probabilité de trouver à une température donnée un certain nombre de paires de bases fondues, diminue lorsque l'on passe du dAT au DNA et du DNA au dGdC : c'est sans doute là l'explication des valeurs de p mesurées pour les complexes de l'acridine orange avec ces différents polymères. L'étude de la variation de p en fonction de la température, effectuée sur les complexes AO-dAT, AO-DNA, AO-dGdC devrait permettre de préciser la notion de "respiration du DNA".

Tableau X (d'après Streisinger et coll.,1966)

e^+

Leu	Leu	Thr	Lys	Sér	Pro	Sér
UU^{A}_{G}	UUG	ACA	AAG	AGU	CCA	UCA
	-G		-G	+GU		
UU^{A}_{G}	UUA	CAA	AAG	UGU	CCA	UCA
Leu	Leu	Gln	Lys	Cys	Pro	Sér

eJD10eJ42eJ17

e^+

Leu	Leu	Thr	Lys	Sér	Pro
UU^{A}_{G}	UU$^{A}_{G}$	ACA	AAG	AGU	CCA
	-G		-G	+UC	
UU^{A}_{G}	UUA	CAA	AAG	UCU (AGU)	CCA
Leu	Leu	Gln	Lys	Sér	Pro

eJD10eJD11

e^+

Thr	Lys	Sér	Pro	Sér	Leu	Asn	Ala
AC.	AA$^{A}_{G}$	AGU	CCA	UCA	CUU	AAU	GC.
	-G						+G
AC.	AAA	GUC	CAU	CAC	UUA	AUG	GC.
Thr	Lys	Val	His	His	Leu	Mét	Ala

eJ42eJ44

Tableau X (suite)

e^+

Lys	Sér	Pro	Sér	Leu	Asn	Ala	Ala
AA^A_G	AGU	CCA	UCA	CUU	AAU	GC.	
		+GU				+G	
AA^A_G	AGU	GUC	CAU	CAC	UUA	AUG	GC.
Lys	Sér	Val	His	His	Leu	Mét	Ala

eJ17eJ44

e^+

Mét	Asn	Ile	Phe	Glu	Mét	
AUG	AAU	AUC	UU^U_C	GA^A_G		
+G		+AU				
AUG	GAA	UAU	AUC	UU	GA^A_G	
Mét	Glu	Tyr	Ile	Phe	Glu	Mét

eJ16eJD12

Dans le cas des mutants induits par la proflavine on observe la répétition des nucléotides précédent une cytosine dans les mutants eJ16, eJ17, eJ44. On observe la délétion d'une guanine pour la mutation eJ42.
Les positions respectives des mutations eJ16 et eJD12 n'étant pas déterminées, nous avons attribué l'addition de G à la mutation spontanée eJD12.

Tableau XI (d'après Imada et coll., 1970)

e^+

Asp	Ala	Ala	Val	Arg	Gly	
GA^{U}_{C}	GCU	GCU	GUU	CG^{U}_{C}	GG.	
		+GCUG		-C		
GA.	GCU	GGC	UGC	UGU	UG^{U}_{C}	GG.
Asp	Ala	Gly	Cys	Cys	Cys	Gly

eJ28eJD2

e^+

Asp	Ala	Ala	Val	Arg	Gly	
GA.	GCU	GCU	GUU	CG^{U}_{C}	GG	
	+G			-C		
GA	GGC	UGC	UGU	UG^{U}_{C}	GG.	
Asp	Gly	Cys	Cys	Cys	Gly	

eJD6eJD2

On observe dans la mutation eJ28 la répétition de la séquence précédent une cytosine.

Tableau XII (d'après Okada et coll., 1970)

Tyr	Lys	Asp	Thr	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Thr	
UA^{U}_{C}	AAA	GAC	ACG	GAA	GG^{U}_{C}	UA^{U}_{C}	UA^{U}_{C}	AC.	
		+AGACA		-G	-G				
UA^{U}_{C}	AAA	GAC	AAG	ACA	GAA				
Tyr	Lys	Asp	Lys	Thr	Gln	Gly	Tyr	Tyr	Thr

eJR13eJD5

Tyr	Lys	Asp	Thr	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Thr
UA^{U}_{C}	AA^{A}_{G}	GAC	ACG	GAA	GG^{U}_{C}			
		+GA	-G	-G				
UA^{U}_{C}	AA^{A}_{G}	GAG	ACA	CAA	GG^{U}_{C}			
Tyr	Lys	Glu	Thr	Gln	Gly			

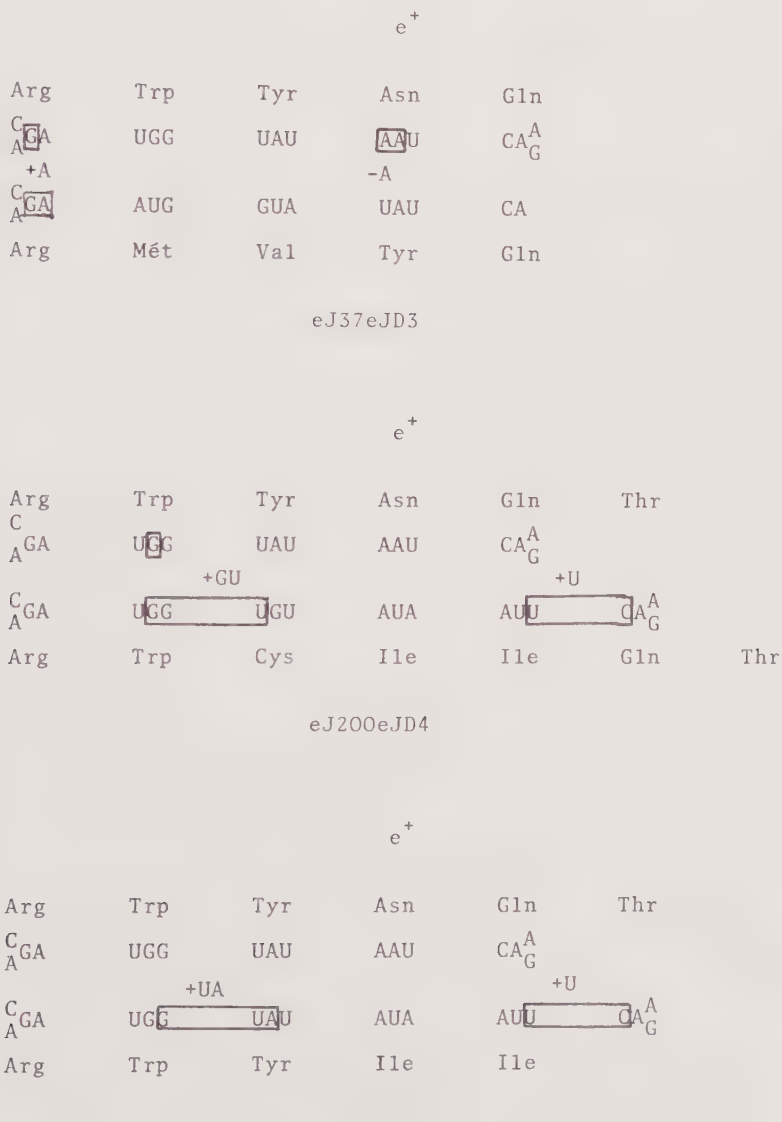
eJR14eJD5

Tyr	Lys	Asp	Thr	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Thr
UA^{U}_{C}	AA^{A}_{G}	GAC	ACG	GAA	GG^{U}_{C}	UA^{U}_{C}	UAC	ACC
			-G	-G				+AC
UA^{U}_{C}	AA^{A}_{G}	GAC	ACA	AGG	$^{U}_{C}UA$	$^{U}_{C}UA$	CAC	ACC
Tyr	Lys	Asp	Thr	Arg	Leu	Leu		

eJD5eJ201

On observe dans les mutations eJR13, eJR14 et eJ201 induites par la proflavine, la répétition de la séquence précédent une cytosine.

Tableau XIII (d'après Tsugita et coll., 1969)



On observe dans les mutations induites par la proflavine (eJ37, eJ200, eJ25) la répétition de la séquence suivant une guanine.

C) COMPLEXES A TRANSFERT DE CHARGE ET MUTAGENESE

Des cinq colorants étudiés ici, seule l'acridine orange n'est pas susceptible de former un complexe à transfert de charge. Les autres colorants, par contre, peuvent former ce type de complexe, mais uniquement avec les plateaux GC.

A ces deux constatations une étude bibliographique de la mutagénèse permet d'en ajouter une troisième : l'acridine orange est le seul des colorants étudiés ici à n'être point mutagène. Une question vient alors tout naturellement à l'esprit : la formation d'un complexe à transfert de charge est-elle responsable du pouvoir mutagène des acridines ? Si tel est le cas, seul le plateau GC sera impliqué dans l'évènement mutationel.

Nous avons recherché dans la littérature différents exemples de mutations provoquées par les acridines (proflavine en particulier). Les mutations du gène lysozyme du bactériophage T_4 étudiées par différents auteurs nous ont fourni les exemples recherchés (Streisinger, Okada, Emrich, Newton, Tsugita, Terzaghi, Inouye, 1966 ; Imada, Inouye, Eda, Tsugita, 1970 ; Okada, Amagase, Tsugita, 1970 ; Tsugita, Inouye, Imagawa, Nakanishi, 1969). Ces auteurs ont étudié pour différents mutants les modifications de la séquence des acides aminés du lysozyme : on en déduit à l'aide du code génétique proposé par Nirenberg et Khorana les séquences correspondantes des bases du RNA messager. Ces séquences sont reproduites dans les tableaux X, X1, X11 et X111. Chaque mutation y est répertoriée dans la nomenclature utilisée par les auteurs où :

- eJ désigne une mutation induite par la proflavine,
- eJD une mutation spontanée,
- et eJR une réversion induite par la proflavine.

Nous avons, pour chaque mutation considérée, encadré les bases supposées modifiées dans le RNA messager de la souche sauvage, ainsi que les modifications correspondantes de la séquence des bases du RNA messager de la souche mutante.

Les évènements mutationels observés sont de deux types :

1) des additions de bases : c'est le processus le plus souvent observé dans les mutations induites par la proflavine. Dans les différents cas observés ici ces additions peuvent s'interpréter :

Représentation schématique des modifications induites par un colorant au niveau d'une paire GC lors de la replication du DNA.
(——— DNA ; ----- RNA messager).
Si l'on suppose la replication en discontinu de l'un des brins, les résultats diffèrent selon la base située sur ce brin. (cytosine, XIVa ; guanine, XIVb).

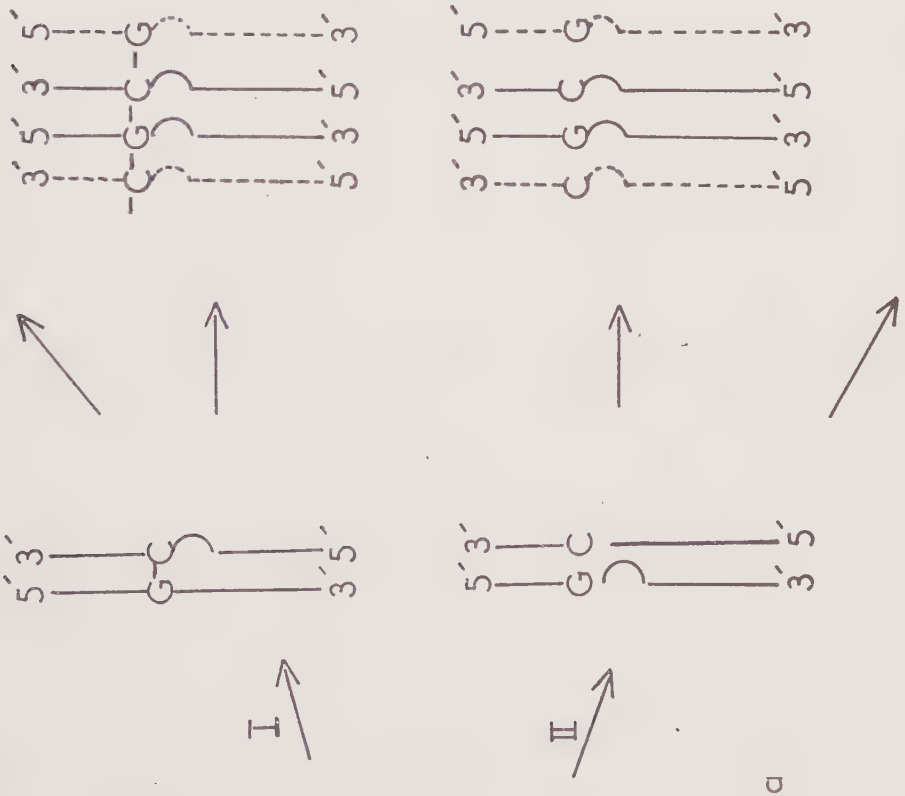


Tableau XIV a

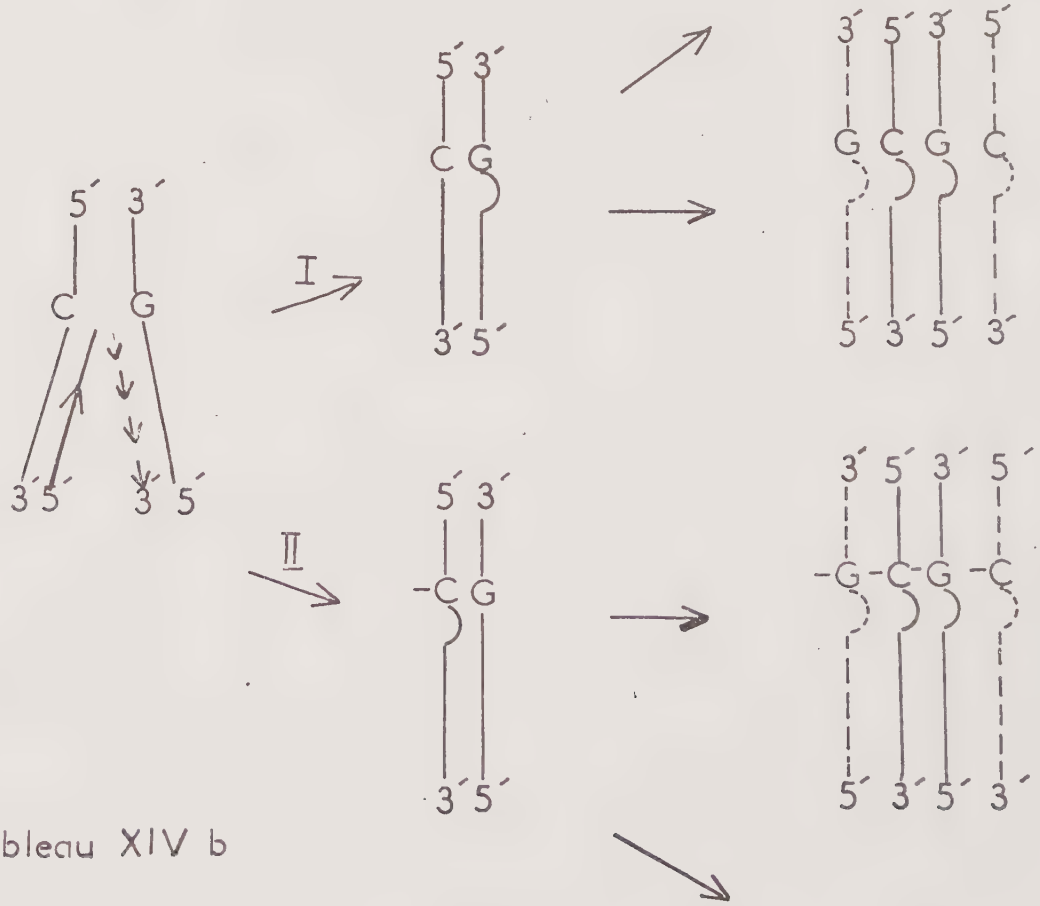


Tableau XIV b

- soit comme la répétition de la base ou des bases précédant une cytosine dans la séquence du RNA messager de la souche sauvage,

- soit, toujours dans la même séquence, comme la répétition de la base ou des bases suivant une guanine.

2) des délétions de bases : nous observons,dans le cas des mutants induits par la proflavine, une seule délétion (eJ42) : la base délétée est susceptible d'être une guanine.

Notons que le même mécanisme rend compte de la plupart (mais non pas de toutes) des mutations spontanées.

Nous avons représenté dans le tableau XIV nos hypothèses concernant la replication du DNA d'une souche sauvage traitée par la proflavine. Dans le mécanisme choisi la replication de l'un des brins du DNA se fait de façon discontinue (Okasaki, Okasaki, Sakabe, Sugimoto, Kainuma, Sugino et Iwatsuki, 1968). Si l'on considère la replication du DNA d'un point de vue cinétique, la stabilisation de la double hélice par le colorant peut entrainer au niveau des paires GC touchées :

- un bloquage momentané de l'enzyme de replication sur la chaîne polynucléotidique,

- et partant, la répétition de la base ou des bases précédent la paire GC touchée.

Lors de l'ouverture de la paire GC, le colorant fixé reste au voisinage de la guanine, continuant à former avec celle-ci un complexe à transfert de charge et empêchant par là sa reconnaissance par l'enzyme de replication. La formation d'un tel complexe est compatible avec les valeurs théoriques calculées par Pullman (1964) des énergies des orbitales moléculaires (de fait, le poly-rG éteint bien la fluorescence de la proflavine ainsi que nous avons pu le vérifier). Lorsque l'enzyme de replication reprend sa progression, la guanine de l'un des brins n'est pas lue (délétion), la cytosine du brin complémentaire est lue normalement.

Si le mécanisme proposé est exact, nous devrions pouvoir observer huit types de mutations différents, se traduisant dans la séquence du RNA messager par :

- la répétition des bases avant ou après une guanine ou une cytosine délétée,

- la répétition des bases avant ou après une guanine ou une cytosine lue.

Nous sommes loin d'observer toutes les mutations prédites. En particulier les mutants prévus par la replication en continu de l'un des brins du DNA,en présence de colorant, ne sont jamais observés. Il en est de même, pour deux des quatre mutants qui devraient résulter de la synthèse discontinue d'un nouveau brin de DNA, lorsque la base modifiée sur le brin mère est une guanine. On peut essayer d'expliquer la première de ces deux constatations : l'addition d'une ou de plusieurs bases à la chaîne polynucléotidique en voie de formation, implique fort probablement un glissement de celle-ci le long du brin de DNA ayant servi de matrice. Ce glissement est possible lorsque la chaîne polynucléotidique en début de formation n'est pas encore correctement appariée avec le brin mère; il est par contre impossible, pour le brin synthétisé en continu, dont la plus grande partie est déjà sous forme de double hélice. Le seul évènement mutationel observé sur ce brin sera la délétion de la guanine.

La deuxième constatation est par contre plus difficile à expliquer. Tout se passe comme si la délétion d'une base interrompait de manière définitive la chaîne polynucléotidique synthétisée de façon discontinue.

L'analyse d'un plus grand nombre de mutants devrait permettre de tester de manière définitive la valeur de nos hypothèses.

CONCLUSION

Ce travail peut, à première vue, paraître présenter deux aspects nettement distincts : l'aspect physicochimique d'une part, l'aspect plus proprement biologique d'autre part.

En établissant la liaison entre certaines modifications de structure électronique et les perturbations de lecture du message génétique, nous montrons que ces deux aspects ne constituent en fait que deux approches différentes d'un même problème fondamental : l'étude des mécanismes physiques de l'information génétique.

1) L'aspect purement physicochimique

Il comporte deux résultats essentiels :

- Le modèle proposé pour la fixation de l'ion cuivrique sur le DNA : ce modèle est très probablement valable pour la fixation sur le DNA d'un grand nombre d'ions divalents ; il est le seul à rendre compte de l'ensemble des données connues jusqu'à présent, mais nécessiterait pour être complet, que soit précisée la nature des liaisons entre le cuivre et les guanines.

- L'explication des propriétés de fluorescence des complexes colorants-DNA lorsque l'on utilise des DNA de compositions en bases différentes, en particulier dans le cas des complexes Pro-DNA et Acri-DNA, ainsi que pour les complexes AO-DNA où il existe bien deux types de sites que leurs propriétés de fluorescence ne permettent pas de distinguer.

2) L'aspect biologique

Nous voudrions souligner ici ce qui, dans notre étude, apparaît peut-être comme le résultat essentiel : la mise en évidence de la sensibilité particulière des seules paires GC à l'action de mutagènes aussi différents que l'ion cuivrique ou les colorants d'acridine. Ce fait est à rapprocher des constatations de différents auteurs tendant à montrer que les paires GC constituent la partie la plus instable du génome : les mutations spontanées sont en effet beaucoup plus fréquentes au niveau des paires GC

que des paires AT (Freeze, 1961 ; Freeze, 1963 ; Drake, 1966). On peut alors se demander si les mutations dites spontanées sont bien toujours le résultat d'une simple tautomérisation des bases du DNA, ou si elles ne sont pas souvent la conséquence de la présence accidentelle d'un agent susceptible de perturber la structure électronique des bases du DNA (des GC en particulier). Il est à cet égard significatif de constater que la plupart des mutations spontanées observées peuvent être expliquées par le même mécanisme que celui invoqué pour expliquer les mutations induites par la proflavine.

Si l'action mutagène des produits ici étudiés est bien localisée au niveau des paires GC, le mécanisme de cette action reste par contre sujet à hypothèse.

- Le manque de données sur les mutants induits par Cu^{++} ne nous permet, ni de proposer un modèle rendant compte de son action mutagène, ni de préciser si cette action a lieu au niveau des complexes du type II ($\begin{smallmatrix}GC\\GC\end{smallmatrix}$) ou des complexes du type III (chélate entre guanine et phosphate). Au complexe du type II correspond, comme nous l'avons vu, une stabilisation de la double hélice : elle pourrait, si l'hypothèse développée précédemment est correcte, rendre compte de l'addition de bases au génome de la souche mutante. Aux complexes des types II et III correspondent de plus des modifications de la structure électronique de la paire GC dont nous ne pouvons, dans l'état actuel de nos connaissances, supputer l'effet sur le fonctionnement de l'enzyme de replication.

- Dans le cas des mutations induites par les colorants d'acridine, les données disponibles dans la littérature nous ont permis d'aller plus loin dans l'explication de l'action mutagène de ces produits. Si l'intercalation de ces substances entre les plateaux de base du DNA est toujours réalisée et fort probablement nécessaire à l'action mutagène, elle n'est néanmoins pas suffisante. On a constaté en effet que l'acridine orange a un effet protecteur vis-à-vis des mutations induites par les autres colorants d'acridine (Schwartz, 1959). En d'autres termes, l'intercalation de l'acridine orange dans le DNA, en empêchant l'intercalation ultérieure d'une autre molécule de colorant, empêche

la formation du complexe à transfert de charge responsable de la mutagénèse : pour les colorants mutagènes étudiés ici, l'intercalation est donc nécessaire à la formation du complexe à transfert de charge. Ce ne serait pas le cas pour une substance comme l'OHSA (hydroxystilbamidine) qui ne semble pas s'intercaler (Festy, 1971) et est néanmoins mutagène. C'est donc la modification de la structure électronique de la paire GC et non la modification morphologique due à l'intercalation qui est responsable des modifications apportées au génome de la souche sauvage, modifications se traduisant par l'addition ou la délétion de bases.

1) L'addition de bases

Nous l'avons attribuée à l'instar de Streisinger et col. (1966) à la stabilisation de la double hélice par les colorants d'acridine. Le phénomène n'est sans doute pas aussi simple : d'une part, tous les colorants d'acridine stabilisent le DNA même s'ils ne sont pas mutagènes (AO), d'autre part, cette stabilisation affecte les paires AT comme les paires GC, et ce quel que soit le colorant utilisé (Kleinwächter, Balcarova, Bohacek, 1969 ; Kleinwächter, Koudelka, 1964). Par contre, la 9-aminoacridine stabilise beaucoup mieux le DNA que l'acridine orange (Riva, 1966). On peut alors avancer deux explications à l'origine du blocage momentané de la progression de l'enzyme de replication, blocage responsable dans notre hypothèse de l'addition de bases observée dans le genome du mutant.

- Il est bien causé par la stabilisation de la double hélice, mais la stabilisation provoquée par l'intercalation du colorant n'est suffisante ni au niveau des paires AT, ni même avec l'acridine orange au niveau des paires GC.

- C'est le fait de ne pouvoir lire la guanine qui bloque la progression de l'enzyme.

L'étude détaillée des modifications de la structure électronique des paires GC provoquées par la présence de différents colorants (ou de Cu^{++}), en particulier les calculs des énergies d'interaction des complexes intermoléculaires ainsi formés devraient permettre d'évaluer dans chaque cas les contributions du type transfert de charge à l'énergie totale d'interaction, de rendre compte des différences de stabilité observées, et de comprendre pourquoi la mutagénèse résulte de la formation d'un complexe à transfert de charge.

Rappelons enfin que l'addition de bases ne semble possible que sur un brin synthétisé de façon discontinue et ce, bien que le modèle d'Okasaki et col. ait récemment été mis en question par Werner (1971).

2) La "délétion" de bases

Les seules bases omises sont les guanines. Bien que, dans les exemples examinés, la délétion de la guanine soit rare (un seul cas), le phénomène est probablement très général. La mutation "petite" de la levure se traduit en effet par une perte de DNA mitochondrial (Goldring, Grossman, Marmur, 1970) et une augmentation du rapport A+T/G+C (Mounolou, Jacob, Slonimski, 1966, 1967 ; Bernardi, Carnevali, Nicolaïeff, Piperno, Tecce, 1968 ; Mehrotra et Mahler, 1968).
Area, Caneva, Frontali (1970) ont noté par ailleurs qu'en présence de proflavine, la DNA polymérase replique préférentiellement les régions AT.

A défaut d'expliquer le mécanisme des mutations, l'analyse de DNA résultant d'expériences de replication conduites sur des polydésoxyribonucléotides modèles (séquence de AT ne contenant que quelques GC judicieusement placés), en présence de proflavine, devrait permettre de préciser les modifications de fonctionnement de l'enzyme de replication dans ces conditions.

On peut facilement concevoir que si certains types de perturbation électronique des bases du DNA modifient le fonctionnement de la DNA polymérase, ce même type de perturbation puisse modifier d'autres actions enzymatiques s'effectuant au niveau du DNA : l'apparition de la forme "petite" de la levure en l'absence de replication pourrait ainsi s'expliquer par une perturbation du fonctionnement de la RNA polymérase rendant impossible la synthèse des cytochromes.

En essayant d'élucider le mécanisme d'action de deux agents mutagènes très différents, notre étude débouche en fait sur l'un des problèmes les plus importants de la biologie moléculaire : la lecture du message génétique et la régulation de

son expression à tous les stades. On sait qu'il doit exister pour chaque étape (replication, transcription, traduction) des mécanismes de reconnaissance spécifique entre les séquences nucléotidiques et les séquences peptidiques. Ce travail, limité essentiellement à la compréhension du mécanisme de replication, constitue cependant une première indication sur la manière d'aborder le problème plus général des mécanismes de reconnaissance : l'analyse fine des conformations locales et des répartitions électroniques permettant de rendre compte d'une spécificité excluant presque toute possibilité d'erreur.

Ce domaine commence à être abordé ; il reste à trouver les techniques d'études permettant de l'explorer complètement.

BIBLIOGRAPHIE

Area, M., Caneva,R., Frontali, L. (1970) G. Bot. Ital. 104, 303.

Armstrong, R.W., Kurucsev, T., Strauss, U.P. (1970)
J. Amer. Chem. Soc. 92 (10) 3174.

Barnett, L., Brenner, S., Crick, F.H.C., Shulman, R.G., et
Watts-Tobin, R.J. (1967) Phil. Trans. B. 252, 487.

Bauer, W., et Vinograd, J. (1968) (1970) J. Mol. Biol. 33, 141
J. Mol. Biol. 47, 419.

Bay, Z. (1950) Phys. Rev. 77, 419.

Belokobylskii, A.I., Cinturi, L.N., Mosulishvili, L.M.,
Kaarabadze, N.Y. (1968) Biophysica 13, 650.

Berg, R., Fancher, H., Chamber lin, M. (1963)
Dans Informational Macromolecules Ac. Press.

Berger, H., Brammar, W.J., et Yanofsky, C. (1968) J. Mol. Biol.34,219

Bernardi, G., Carnevali, F., Nicolaieff, A., Piperno, G., et
Tecce, G. (1968) J. Mol. Biol. 37, 493.

Bidet, R., Chambron, J., et Weill, G. (1971) Biopolymers 10, 225.

Blacke, A., et Peacocke, A.R. (1968) Biopolymers 6, 1225.

Bollum, F.J. (1965) J. of Biol. Chem. 240, 2599.

Brahms, J., et Mommaerts, W.F.H.M. (1964) J. Mol. Biol. 10, 73.

Brenner, S., Barnett, L., Crick, F.H.C., et Orgel, A. (1961)
J. Mol. Biol. 3, 121.

Bryan, S.E., Frieden, E. (1967) Biochemistry 6, 2728.

Chan, L.M., et Mc Carter, J.A. (1970) B.B.A. 204, 252.

Chan, L.M., et Van Winckle, Q. (1969) J. Mol. Biol. 40, 491.

Clément, R. (1971) Thèse 3e cycle (Strasbourg)

Clowes, R.C., et Rowley, D. (1955) J. Gen. Microbiol. 13, 461.

Coates, H., et Jordan, D.O. (1965)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 611.

Cohen, G., et Eisenberg, H. (1969) Biopolymers 8, 54.

Crick, F.H.C., Barnett, L., Brenner, S., et Watts-Tobin, R.J. (1961)
Nature 192, 1227.

Demerec, M., Janson, J. (1951) Cold Spring Harbor Symp. 16, 215.

Drake, J.W. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. US 55, 738.
Eichhorn, G.L., Clarck, P., et Becker, E.D. (1966)
Biochemistry 5, 245.
Eichhorn, G.L., Shin, Y.A. (1968) Biochemistry 7, 1026.
Eichhorn, G.L., Tarien, E. (1967) Biopolymers 5, 283.
Einstein, A. (1917) Physik Z. 18, 121.
Eisinger, J., et Navon, J. (1969) J. Chem. Phys. 50, 2069
Felsenfeld, G., et Rich, A. (1957) Biochim. Biophys. Acta 26, 457.
Felsenfeld, G., Sandeen, G. (1962) J. Mol. Biol. 5, 587.
Festy, B. (1971) Thèse - Université de Strasbourg.
Fiskin, A.M., et Beer, M. (1965) Biochemistry 4, 1289.
Förster, T. (1951) Fluorescenz Organischer Verbindung,
Vandenhoeck et Ruprecht, Göttingen.
Freese, E. (1961) Proc. Intern. Congr. Biochem. Moscov 1, 204.
Freese, E. (1963) in "Molecular Genetics" Ac. Press, New York 1, 207.
Fritsche, H., et Zimmer, Ch. (1968) Eur. J. Biochem. 5, 42.
Fuller, W., et Waring, M.J. (1964)
Ber. Bunsenges. Physik. Chem. 68, 805.
Fukuhara, H., et Kujawa, C. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun.
41, 1002.
Gierer, A., et Mundry, K.W. (1958) Nature 182, 1457.
Goldring, L.S., Grossman, L.I., et Marmur, J. (1970)
J. Mol. Biol. 52, 323.
Hall, Z.W., Lehman, I.R. (1968) J. Mol. Biol. 36, 321.
Hiai, S. (1965) J. Mol. Biol. 11, 672.
Hirsh, H.M. (1961) J. Bactériol. 81, 448.
Holtzer, A. (1953) J. Polym. Sci. 17, 432.
Hsieh, T., et Buchanan J.H. (1967) P. N. A. S. 58, 2468.
Imada, M., Inouye, M., Eda, M. et Tsugita, A. (1970)
J. Mol. Biol. 54, 199.
Ivanov, V.I., et Minchenkova, L.E. (1965) Biokhimiqa 30, KB.
Josse, J., Kaiser, A.D., et Kornberg, A. (1961)
J. Biol. Chem. 236, 864.
Kay, E.R.M., Simmons, N.S. et Dounce, A.L. (1952)
J. Amer. Chem. Soc. 74, 1724.
Kleinwächter, R.V., Balcarova, Z., et Bohacek J. (1969)
B. B. A. 174, 188.

Kleinwächter, R.V., et Koudelka, J. (1964) B.B.A. 91, 538.
Langridge, R., Rich, A. (1963) Nature 198, 725.
Laustriat, G., Pfeffer, G., Lami, H., et Coche, A. (1963)
Coll. Intern. Electr. Nucl. Paris
Laustriat, G., Pfeffer, G., Lami, H., et Coche, A. (1964)
Acta Physica Polonica 26, 449.
Le Pecq, J., et Paoletti, C. (1967) J. Mol. Biol. 27, 87.
Lerman, L.S. (1961) J. Mol. Biol. 3, 18.
Lerman, L.S. (1963) Proc. Nat. Acad. Sci. US 49, 94.
Lerman, L.S. (1964) J. Cell. Comp. Physiol. 64, spl 1.
Lindegreen, C.C., Nagai, S., and Nagai, H. (1958) Nature 182, 446
Luzikov, V.N., Zubatov, A.S., Rainina, E.I. (1970)
Dokl.Akad. Nauk. SSSR 195, 1453.
Luzzati, V., Masson, F., et Lerman, L.S. (1961)
J. Mol. Biol. 3, 634.
Magni, G.E., Von Borstel, R.E., et Sora, S. (1964)
Mutation Res. 1, 227.
Maillet, S., Thèse - Université de Strasbourg (1970)
Marcovich, H. (1953) Ann. Inst. Pasteur 85, 199.
Mauss, Y., Chambron, J., Daune, M., et Benoit, H. (1967)
J. Mol. Biol. 27, 579.
Mehrotra, B.D., et Mahler, H.R. (1968) Arch. Biophys. 128, 685.
Minchenkova, L.E., et Ivanov, V.I. (1967) Biopolymers 5, 283.
Mounolou, J.C., Jakob, H., Slonimski, P.P. (1966)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 218.
Mounolou, J.C., Jakob, H., et Slonimski, P.P. (1967)
The Control of Nuclear Activity - L. Goldstein editor
Prentice-Hall, Inc. 413.
Mulliken, R.S. (1964) J. Chim. Phys. -1, 20.
Nagai,S., Yanagishima, N., et Nagai, H. (1961) Bact. Rev. 25, 404.
Nakamura, H. - non publié.
Okada, Y., Amagase, S., et Tsugita, A. (1970)
J. Mol. Biol. 54, 219
Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., Kainuma, R.,
Sugino, A., et Iwatsuki, N. (1968)
Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 129.
Orgel, A. (1954) Quart. Rev. 8, 422.
Orgel, A., et Brenner, S. (1961) J. Mol. Biol. 3, 762.
Orgel, A., et Orgel, L.E. (1965) J. Mol. Biol. 14, 453.
Paoletti, J., et Le Pecq, J.B. (1971) J. Mol. Biol. 59, 43.

Peacocke, A.R. (1970) Stud. Biophys. 24, 25 ; 213, 224.
Pfeffer, G., Lami, H., Laustriat, G., et Coche, A. (1963)
C.R. Acad. Sciences 257, 434.
Pritchard, N.J., Blacke, A., et Peacocke, A.R. (1966)
Nature 212, 1360.
Pullman, B., et Pullman, A. (1963)
Quantum Biochemistry - Interscience Publishers
Rich, A., Davies, D., Crick, F.H.C.,et Watson, J.D.(1961)
J. Mol. Biol. 3, 71.
Richard, H., et Pacault, A. (1970) Biopolymers (sous presse).
Ropars, C. (1966) Mem. Museum Nat. Hist. Nat. (Paris) Sér.D.3, 100.
Schack, J., et Bynum, B.S. (1964) J. Biol. Chem. 239, 3843.
Schreiber, J.P., et Daune, M. (1968) Biopolymers 8, 139.
Schwartz, G. (1959) Dissertation Techn. Hochschule Braunschweig W.
Germany.
Singer, B., et Fraenkel-Conrat H. (1962) Biochemistry 1, 852.
Streisinger, G., Okada, Y., Emrich, J., Newton, J., Tsugita, A.,
Terzaghi, E., et Inouye, M. (1966)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 77.
Thomès, J.C., Weill, G., et Daune, M. (1969) Biopolymers 8, 647.
Tsugita, A., Inouye, M., Imagawa, T., Nakanishi, T., Okada, Y.,
Emrich, J. et Streisinger, G. (1969) J. Mol. Biol. 41, 349.
Tubbs, R.K., Ditmars, W.E., et Van Winkle, Q. (1964)
J. Mol. Biol. 9, 545.
Veis, A. (1970) in Biological polyelectrolytes, chez Dekker.
Venner, H., et Zimmer,Ch. (1966) Biopolymers 4, 321.
Wacker, W.E.C., et Vallée, B.L. (1959) J.Biol. Chem. 234, 3257.
Wahl, P., Paoletti, J., et Le Pecq, J.B. (1970)
Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 65, 417.
Waring, M.J. (1968) Nature 219, 1320 (N° 5161).
Waring, M.J. (1970) Stud. Biophys. 24-25, 257.
Warner, R.C., et Breslow, E. (1958)
Proc. Intern. Congr. Biochem. 4th Vienna 9, 157.
Webb, R.B., et Kubitschek, H.E. (1963)
Biophys. Biochem. Res. Commun. 13, 90.

Weber, G. (1956) J. Opt. Soc. Amer. 46, 962.
Weed, L.L., et Longfellow D. (1954) J. Bactériol. 67, 27.
Weed, L.L. (1963) J. Bactériol. 85, 1003.
Weill, G. (1965) Biopolymers 3, 567.
Weill, G., et Calvin, M. (1963) Biopolymers 1, 401.
Werner, R. (1971) Nature 230, 570.
Wiberg, J.S. (1958) Arch. of Bioch. and Bioph. 73, 337.
Wilson, R.G., Russo,J.F., et Steck, T.L. (1970) B.B.A. 204, 412.
Yanagishima, N. (1957) J. Inst. Polytech. Osaka City Univ. Ser. D. 8, 35.
Yatsimirskii, K.B., et Kriss, E.E. (1966) Dokl. Akad. Nauk. SSSR 168, 840.
Yatsimirskii, K.B., et Kriss, E.E. (1966) Mol. Osn. Zhiznennykh. Protcessov. 47.
Zimmer, C., Luck, G., Fritzsche, H., et Triebel, H. (1971) Biopolymers 10, 441.
Zimmer, C., et Venner, H. (1967) Stud. Biophysica 2, 207.
Zimmermann, B.K. (1966) J.Biol. Chem. 241, 2035.